

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-186880

(P2001-186880A)

(43) 公開日 平成13年7月10日 (2001.7.10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		B 0 1 L 3/02	C 2 G 0 5 8
B 0 1 L 3/02			Z 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
		C 1 2 N 15/00	A 4 G 0 5 7
審査請求 未請求 請求項の数33 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-69285 (P2000-69285)

(22) 出願日 平成12年3月13日 (2000.3.13)

(31) 優先権主張番号 特願平11-301627

(32) 優先日 平成11年10月22日 (1999.10.22)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000004064

日本碍子株式会社

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号

(72) 発明者 廣田 寿一

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号 日

本碍子株式会社内

(72) 発明者 高橋 伸夫

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号 日

本碍子株式会社内

(74) 代理人 100077665

弁理士 千葉 剛宏 (外1名)

最終頁に続く

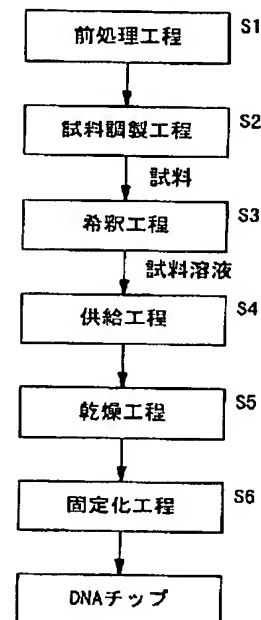
(54) 【発明の名称】 DNAチップの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 コストの高い試料溶液の使用効率を向上させて、DNAチップの生産性の向上及び歩留まりの向上を図る。

【解決手段】 基板の表面にpoly-L-lysine層を形成する前処理工程 S1 と、DNA断片を含む試料を調製する試料調製工程 S2 と、得られた試料の濃度を希釈する希釈工程 S3 と、希釈された試料溶液を基板上に供給してDNAチップを製造する供給工程 S4 とを有する。前記試料調製工程 S2 は、DNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する増幅工程と、得られたPCR産物を乾燥してDNA粉末とする粉末生成工程と、得られたDNA粉末を緩衝液に溶かす混合工程とを含む。

FIG. 1



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料溶液を基板上に供給して、前記基板上に試料溶液によるスポットが多数配列された DNA チップを製造する DNA チップの製造方法において、同一スポットについて、前記試料溶液を複数回供給することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 2】 請求項 1 記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液をインクジェット方式で供給することを中心とする DNA チップの製造方法。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液は、DNA 断片を含む試料が所定の濃度に希釈されていることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 4】 請求項 3 記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液は、前記 DNA 断片を含む試料が水又は塩化ナトリウムを含む水溶液で希釈されていることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 5】 請求項 3 又は 4 記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液は、ポリマーを含む水溶液で希釈されていることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 6】 請求項 3～5 のいずれか 1 項に記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液は、前記同一スポットに対する複数回の供給によって、1 スポット当たりの最終所望塩基対を満足する程度の濃度に希釈されていることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 7】 請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の DNA チップの製造方法において、前記 DNA 断片を含む試料は、前記 DNA 断片を PCR 増幅して PCR 産物を調製する工程と、前記 PCR 産物を乾燥して DNA 粉末とする工程と、前記 DNA 粉末を緩衝液に溶かす工程とを踏んで調製されることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 8】 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、少なくとも 1 個以上の基体に、外部から前記試料溶液を注入するための注入口と、前記試料溶液が注入・充填されるキャビティと、前記試料溶液を吐出する吐出口とが形成され、前記キャビティを形成する前記基体の少なくとも一壁面に圧電／電歪素子を備え、前記キャビティ内において前記試料溶液が移動するように構成されたマイクロピペットが複数配列されて構成され、かつ、各マイクロピペットの吐出口からそれぞれ異なる種類の試料溶液が吐出される分注装置を用いることを特徴とする DNA

A チップの製造方法。

【請求項 9】 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、少なくとも 1 個以上の基体に、外部から前記試料溶液を注入するための注入口と、前記試料溶液が注入・充填されるキャビティと、前記試料溶液を吐出する吐出口とが形成され、前記キャビティ内において前記試料が移動するように構成されたマイクロピペットが複数配列されて構成され、かつ、少なくとも 2 つ以上の吐出口から同じ種類の試料溶液が吐出され、1 つのスポット形成する分注装置を用いることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 10】 請求項 9 記載の DNA チップの製造方法において、前記同じ種類の試料溶液が吐出される前記少なくとも 2 つ以上の吐出口が連結するキャビティに連通する注入口が 1 つであることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 11】 請求項 9 又は 10 に記載の DNA チップの製造方法において、前記同じ種類の試料溶液を前記少なくとも 2 つ以上の吐出口からほぼ同時に吐出することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 12】 請求項 9 又は 10 に記載の DNA チップの製造方法において、前記同じ種類の試料溶液を前記少なくとも 2 つ以上の吐出口からそれぞれ吐出タイミングをずらして吐出することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 13】 請求項 8～12 のいずれか 1 項に記載の DNA チップの製造方法において、マイクロピペットは、前記キャビティ内において前記試料溶液が層流で移動するように構成されていることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 14】 請求項 8～13 のいずれか 1 項に記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、それぞれ異なる種類の試料溶液を吐出する前記吐出口に対応する前記注入口からそれぞれ異なる種類の試料溶液を前記複数のキャビティ内に注入した後、前記圧電／電歪素子を駆動させることにより、前記複数のキャビティ内の種類の異なる試料溶液を前記吐出口から吐出させることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 15】 請求項 8 記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、前記複数のキャビティ内に予め置換液を充填し、次いで、種類の異なる試料溶液を前記注入口から前記複数のキャビティ内で置換させながら注入した後、前記圧電／電歪素子を駆動させることにより、前記複数のキャビティ内の異なる種類の試料溶液を前記吐出口から吐出させ

ることを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項16】請求項15記載のDNAチップの製造方法において、

前記複数のキャビティ内に予め置換液を充填し、前記圧電／電歪素子を駆動させながら種類の異なる試料溶液を前記注入口から前記複数のキャビティ内で置換させながら注入することを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項17】請求項14～16のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記複数のキャビティ内における試料溶液の注入又は置換完了を、前記キャビティ内の流体特性の変化を検知することにより把握することを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項18】請求項15～17のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、前記置換液が脱泡処理されていることを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項19】請求項15～18のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記複数のキャビティ内に予め置換液を充填し、次いで、前記試料溶液と比重をほぼ同じくするDNA断片を含まない中間液を前記注入口から前記キャビティ内で置換させながら注入した後、種類の異なる試料溶液を前記注入口から前記キャビティ内に注入し、前記圧電／電歪素子を駆動させることにより、前記複数のキャビティ内の異なる種類の試料溶液を前記吐出口から吐出させることを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項20】請求項1～19のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、少なくとも前記試料溶液を乾燥もしくは増粘もしくは固化させながら行うことを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項21】請求項20記載のDNAチップの製造方法において、

前記乾燥もしくは増粘もしくは固化処理として、前記基板を加熱することを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項22】請求項20記載のDNAチップの製造方法において、

前記乾燥もしくは増粘もしくは固化処理として、吐出もしくは供給された前記試料溶液を加熱することを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項23】請求項20～22のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記乾燥もしくは増粘もしくは固化処理として、レーザ光を用いることを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項24】請求項20～22のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記乾燥もしくは増粘もしくは固化処理として、赤外線を用いることを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項25】請求項20～22のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記乾燥もしくは増粘もしくは固化処理として、電磁波を用いることを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項26】請求項20記載のDNAチップの製造方法において、

前記乾燥もしくは増粘もしくは固化処理として、基板又は吐出もしくは供給された前記試料溶液を冷却することを特徴とするDNAチップの製造方法。

10 【請求項27】請求項1～26のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、供給位置をずらしながら供給し、1つのスポットを形成することを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項28】請求項1～27のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、供給量を変化させて供給し、1つのスポットを形成することを特徴とするDNAチップの製造方法。

20 【請求項29】請求項1～28のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記試料溶液を前記基板上に供給する際、あるいは供給するに先立って、前記試料溶液に振動を与えることを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項30】試料溶液を基板上にインクジェット方式で供給して、前記基板上に前記試料溶液によるスポットが多数配列されたDNAチップを製造するDNAチップの製造方法において、

30 前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、前記試料溶液を吐出、供給する箇所の周りの湿度をその他の部分より選択的に高くして、前記試料溶液を乾燥もしくは増粘もしくは固化しないようにしたことを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項31】請求項1～30のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記基板上に前記試料溶液が供給されてスポットが多数配列された基板を作製した後に、前記基板を0℃以下に冷却した後、湿度30%以上の十分な体積の気体が存在する室温下に戻す工程を含むことを特徴とするDNAチップの製造方法。

40 【請求項32】請求項1～30のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

前記基板上に前記試料溶液が供給されてスポットが多数配列された基板を作製した後に、前記基板を湿度80%以上の十分な体積の気体が存在する雰囲気下にさらす工程を含むことを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項33】請求項1～30のいずれか1項に記載のDNAチップの製造方法において、

50 前記基板上に前記試料溶液が供給されてスポットが多数配列された基板を作製した後に、前記基板をミストを含

んだ水蒸気中にさらす工程を含むことを特徴とするDNAチップの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、顕微鏡スライドガラス等の基板上に、数千から一万種類以上の異なる種類のDNA断片をスポットとして高密度に整列固定させたDNAチップ（DNAマイクロアレイ）の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年における遺伝子構造の解析方法の進歩にはめざましいものがあり、ヒトの遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子構造が明らかにされてきている。このような遺伝子構造の解析には、顕微鏡スライドガラス等の基板上に数千から一万種類以上の異なる種類のDNA断片をスポットとして整列固定させたDNAチップ（DNAマイクロアレイ）が用いられるようになってきている。

【0003】このDNAチップの製造におけるスポットの形成方法としては、QUILL方式、ピン&リング方式、あるいはスプリングピン方式といった、いわゆるピンによる基板上へのDNA断片を含んだ試料溶液の供給（打ち込み）を行う方式が広く用いられており、いずれの方法を採用した場合であっても、各スポットの容量と形状のばらつきを低く抑えて、各スポット間の距離を一定に保つことが重要となる。

【0004】一方、更なる高密度化に向けて、スポットの形状制御性が良好であり、生産性に優れた新しい方法の開発に対する期待も大きい。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】ところで、図16に示すように、基板200上に、試料溶液の滴下によるスポット202を形成した際、該スポット202は、その表面張力によって半球状となる。この場合、基板200上に固定化される実質的な試料の量としては、基板200に接する僅かな部分204だけであり、その量は、全体（半球状）のごく一部である。残りの部分206は、固定化されていないため、その後の洗浄工程で洗い流されてしまい、試料溶液の損失が多く、試料溶液の使用効率が低いという問題がある。

【0006】DNAチップを製造する際のコストは、実質的に試料溶液の量で支配され、上述の例の場合、ほとんどの試料溶液が流されてしまい、生産効率の向上の点で不利になる。

【0007】また、1つの基板上には、数千から一万種類以上の異なる種類の試料溶液が滴下されることになるが、種類の異なる試料溶液毎に、粘度や表面張力が異なることから、同一のスポット径を得るためには、試料溶液の滴下量を粘度や表面張力等に応じて変える必要がある。

【0008】しかし、従来の手法では、ピンに付着した試料溶液をピンごと基板に物理的に接触させて、試料溶液を滴下するようにしているため、基板上へのスポットの形成を1回の滴下で行うようになっており、きめ細かな滴下制御（滴下量や滴下位置の制御）を行うことができず、基板上に形成されたスポットの径にばらつきが生じるという問題がある。

【0009】また、試料溶液中のDNA断片の基板上への固定化をより確実なものとするため、試料溶液中に有機、あるいは無機ポリマーを混合させ、ポリマー架橋中にDNA断片を物理的に保持する方法も開発されているが、この場合、試料溶液の粘度が増大し、乾燥、増粘、固化しやすいものとなり、スポット形成時の試料のポットライフが短くなったり、1回の滴下量が増えてしまう問題がある。

【0010】本発明はこのような課題を考慮してなされたものであり、コストの高い試料溶液の使用効率を向上させることができ、DNAチップの生産性の向上及び歩留まりの向上を図ることができるDNAチップの製造方法を提供することを目的とする。

【0011】また、本発明の他の目的は、基板上に供給する試料溶液の種類に応じた供給制御を行うことができ、基板上に形成されるスポット径の均一化を図ることができ、DNAチップの品質並びに信頼性の向上を図ることができるDNAチップの製造方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、試料溶液を基板上に供給して、前記基板上に試料溶液によるスポットが多数配列されたDNAチップを製造するDNAチップの製造方法において、同一スポットについて、前記試料溶液を複数回供給することを特徴とする。

【0013】これにより、形状的に精度の高いスポットを基板上に多数配列することができ、DNAチップの歩留まりを向上させることができる。この場合、前記試料溶液をインクジェット方式で供給することが好ましい。

【0014】インクジェット方式により、基板に非接触で高速（～100kHz）に多数の液滴を必要量だけ高精度に基板上に供給することが可能になる。また、試料溶液は、液滴を吐出する吐出口に連結するキャビティ及び注入口を通じて連続的に供給されることから、従来のピン式のように、スポットを形成する毎に試料溶液の供給元（試料ウェル）にピンを移動して試料溶液中にピン先を浸す必要がなくなり、多数の基板上に短時間でスポットを形成することが可能になる。

【0015】また、前記試料溶液は、DNA断片を含む試料を所定の濃度に希釈することが好ましい。この場合、前記試料溶液は、前記DNA断片を含む試料が水又は塩化ナトリウムを含む水溶液あるいはポリマーを含む水溶液で希釈されていることが好ましく、また、前記同

一スポットに対する複数回の供給によって、1スポット当たりの最終所望塩基対を満足する程度の濃度に希釈されていることが好ましい。

【0016】試料の濃度を希釈することにより、試料溶液を基板上に供給し終わった段階での供給流路パス中に付着、残留する試料溶液中の高価なDNA断片の量を相対的に減らすことができるという利点があり、また、濃い試料溶液により、溶液が乾燥、増粘、固化し、吐出口が詰まって吐出不良を引き起こすといった不良が発生することが回避できるという効果もある。更に大きな利点としては、試料溶液を基板上に供給したとき、試料溶液は半球状にはならず、平坦な形状となる。この場合、基板に供給された試料溶液のほとんどが基板上に固定化されるため、その後の洗浄工程でも試料溶液の大半以上が流されてしまうということがなく、試料溶液の使用効率を向上させることができる。

【0017】また、試料溶液に含まれるDNA断片の種類に応じて希釈の度合いを変えて、試料溶液の粘度や表面張力を変化させることにより、基板上に形成される試料溶液のスポット径を均一化させることができる。

【0018】更にまた、前記試料溶液は、ポリマーを含む水溶液で希釈されていることが好ましい。これにより、基板上に供給された後のスポット形状の形状保持性が増し、形状が安定すると共に、スポットの乾燥収縮による形状変化を防止できる。

【0019】このように、本発明においては、コストの高い試料溶液の使用効率を向上させることができ、DNAチップの生産性の向上及び歩留まりの向上を図ることができる。また、滴下する試料溶液の種類に応じた滴下制御を行うことができ、基板上に形成されるスポット径の均一化を図ることができ、DNAチップの品質並びに信頼性の向上を図ることができる。

【0020】そして、前記製造方法において、前記DNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する工程と、前記PCR産物を乾燥してDNA粉末とする工程と、前記DNA粉末を緩衝液に溶かす工程とを踏んで前記試料を調製するようにしてもよい。このような試料は希釈に際し、品質の変化がなく、水溶液への分散性がよく、希釈に適しており、また、希釈時の濃度管理が正確にできる。

【0021】また、前記製造方法において、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、少なくとも1個以上の基体に、外部から前記試料溶液を注入するための注入口と、前記試料溶液が注入・充填されるキャビティと、前記試料溶液を吐出する吐出口とが形成され、前記キャビティを形成する前記基体の少なくとも一壁面に圧電/電歪素子を備え、前記キャビティ内において前記試料溶液が移動するように構成されたマイクロピペットが複数配列されて構成され、かつ、各マイクロピペットの吐出口からそれぞれ異なる種類の試料溶液が吐出される分注装

置を用いるようにしてもよい。

【0022】圧電/電歪素子が駆動する毎に微量液体が吐出口より吐出され、その容積は微小、かつばらつきがなく一定である。駆動周期は、圧電/電歪素子を用いることにより、高周波対応可能となり、吐出に要する時間も短縮される。また、試料溶液を注入してから吐出に至るまでの間、試料溶液は閉空間内を移動するため、途中で乾燥することがない。更には、基体全体を小さくコンパクトに形成可能であるため、試料溶液が移動する流路を短くでき、これにより、流路壁に試料溶液が付着するという問題は最小限に抑えられ、試料溶液の使用効率の劣化を防止することができる。

【0023】また、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、少なくとも1個以上の基体に、外部から前記試料溶液を注入するための注入口と、前記試料溶液が注入・充填されるキャビティと、前記試料溶液を吐出する吐出口とが形成され、前記キャビティ内において前記試料が移動するように構成されたマイクロピペットが複数配列されて構成され、かつ、少なくとも2つ以上の吐出口から同じ種類の試料溶液が吐出され、1つのスポットを形成する分注装置を用いるようにしてもよい。

【0024】2つ以上の吐出口から同じ種類の試料溶液が吐出され、1つのスポットを形成することにより、スポット形成速度がより速まり、スループットが向上する。

【0025】一般に、試料溶液を複数回供給する場合、供給毎にスポット径は増大するが、供給間隔を遅く（長く）したり、後述するように基板上に供給した試料溶液を素早く乾燥、増粘、固化する処理を施せば、スポット径を増大させることなく、供給回数を増やすことができる。

【0026】ここで、供給間隔を長くすることは、吐出口の吐出側に開口した部分での試料溶液が吐出前にある程度乾燥し、粘度が上がった状態、いわゆる半乾き状態で吐出されるため、供給を重ねてもスポット径は増加しないのであるが、この方法では、結果として、スポット形成時間を増大させることになり、好ましくない。また、このような場合、いわゆる半乾き状態を定量的に管理することは制限が多く、吐出不良のノズルが発生しやすい。

【0027】そこで、前記2つ以上の吐出口から同じ種類の試料溶液が吐出され、1つのスポットを形成するようにすると、吐出位置まで吐出口が移動する間、即ち、吐出開始までの待機時間で、吐出口の吐出側に開口した部分での試料溶液の乾燥が進んだ吐出口が2つ以上存在することになり、これらの吐出口により同一の試料溶液を供給することができ、結果として、スポット形成時間を短縮することができる。

【0028】また、万一、吐出不良ノズルが発生した場合、不良が発生していないノイズだけで吐出を行うこ

とにより、高価な試料溶液を無駄にすることが未然に防げる。更に、同じ種類の試料溶液が吐出される少なくとも2つ以上の吐出口が連結するキャビティに連通する注入口が1つである構造は、試料溶液の注入作業の回数を削減でき好ましい。

【0029】また、2つ以上の吐出口から同じ種類の試料溶液を吐出するタイミングは、非接触のインクジェット方式の場合は、同時であってもよい。この場合、吐出される試料溶液の落下点を合わせるようにしてもよい。そうすることにより、スポット形成速度を向上させることができる。

【0030】しかし、基板上に供給される試料溶液の位置精度をより高精度にするために、吐出タイミングをずらして、それぞれの吐出口がスポット形成位置の真上に位置されたときに供給する方法がよい。

【0031】更にまた、前記キャビティ内を試料溶液が層流で移動するように構成されたマイクロピペットが複数配列されて構成されることが好ましい。試料溶液の移動が層流であることで、気泡等の発生が防げ、吐出不良の回避、マイクロピペットの耐久性が増加する。

【0032】前記分注装置を使用する場合においては、それぞれ種類の異なる試料溶液を吐出する前記吐出口に対応する前記注入口からそれぞれ種類の異なる試料溶液を前記複数のキャビティ内に注入した後、前記圧電／電歪素子を駆動させることにより、前記複数のキャビティ内の種類の異なる試料溶液を前記吐出口から吐出させることが好ましい。このような構成により、複数の異なった種類の試料溶液を同じ時期に、クロスコンタミネーションを引き起こすことなく、基板上に供給できる。

【0033】また、前記分注装置を使用する場合においては、複数のキャビティ内に予め置換液を充填し、次いで、種類の異なる試料を前記注入口から前記複数のキャビティ内で置換させながら注入した後、前記圧電／電歪素子を駆動させることにより、前記複数のキャビティ内の種類の異なる試料溶液を前記吐出口から吐出させるようにしてもよい。予め安価な置換液によりキャビティ内を確実に置換した後、高価な試料を置換することにより、吐出不良の発生が完全に防げ、高価な試料を効率よく吐出できる。

【0034】キャビティ内の置換液から試料溶液への置換は、吐出口から真空吸引等で、置換液を吸引排出することにより行ってもよいが、前記圧電／電歪素子を駆動させながら種類の異なる試料を前記注入口から前記複数のキャビティ内で置換させながら注入することが好ましい。そうすることで、排出する置換液の量を精度よく制御でき、高価な試料溶液を無駄に排出することがない。

【0035】置換完了の終点は、試料の移動する速度、体積を予め求めておき、置換時間、排出量等で制御してもよいが、当該キャビティ内の流体特性の変化を検知することにより把握することが、より精度よく終点が検出

でき更に好ましい。

【0036】本発明では、キャビティ内の流体特性の変化を検知して置換完了を把握するようにしているため、流路内で試料溶液と置換液が多少混合しても、その混合している部分と混合していない部分の区別が容易、かつ精度よく判別できる。その結果、置換液と混合してパージしなければならない試料溶液の量を少なくでき、試料溶液の使用効率を上げることができる。

【0037】また、キャビティ内の流体特性の変化は、圧電／電歪素子に振動を励起する電圧を印加し、その振動に伴う電気的定数の変化を検出することにより把握するようにしてもよい。これにより、特別な検出素子等を設置する必要もなく、安価で、高精度な検出ができる。

【0038】なお、前記置換液は、予め脱泡処理されていることが好ましい。こうすることで、置換液のキャビティ内への充填が、途中で気泡等が発生、引っかかることなくスムーズにでき、これにより、試料溶液への置換が確実に行われ、吐出が安定する。更に、キャビティ内に置換液を注入、充填した後、注入口より前記試料溶液と比重をほぼ同じくするDNA断片を含まない中間液を注入し、前記キャビティ内で置換させた後、種類の異なる試料溶液を前記注入口からキャビティ内に注入し、試料溶液の充填を行ってもよい。置換液と試料溶液の間に、安価で前記試料溶液と比重をほぼ同じくするDNA断片を含まない中間液を介することにより、高価な試料溶液が、比重の異なる置換液中に混ざり込み、結果としてパージ量を多くとらなければならないという不具合を回避できる。

【0039】そして、本発明では、マイクロピペットを複数用いるようにしているため、一度に数多くの種類の試料を同時に供給でき、また一部不良の生じたピペットを容易に交換することができ、メンテナンスも容易である。更に、吐出口が縦横に整列配置されているため、例えば、DNAチップのように、基板上にスポットを二次元的に整列固定させる場合に最適となる。

【0040】また、本発明においては、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、少なくとも前記試料溶液を乾燥もしくは増粘もしくは固化させながら行うことが好ましい。これにより、基板上に供給された試料溶液の固定化が早まり、試料溶液の希釈に伴うだれ（スポット径が拡張する現象）を効果的に防止することができる。

【0041】乾燥もしくは増粘もしくは固化処理としては、基板を加熱すること、吐出もしくは供給された試料溶液を加熱すること等が挙げられるが、加熱方法としては、レーザー光、赤外線、電磁波等を用いることが好ましい。

【0042】これらの方法は、特に、微小領域を選択的に加熱することが可能である。本発明のように、吐出された試料溶液によるスポットは、速やかに加熱される必要がある一方、そのスポットのすぐ近くにある吐出口に



において、加熱による乾燥等で吐出不良が生じることを回避しなければならない。このような場合に、上述の乾燥もしくは増粘もしくは固化処理が好適である。特に電磁波は、金属シールドにより確実に遮断できるため、不要な吐出口の加熱を防ぐ場合に好適である。また、レーザー光や赤外線を用いる場合は、これらレーザー光や赤外線を基板に照射して試料溶液を間接的に加熱してもよい。

【0043】また、本発明においては、滴下する試料溶液の乾燥もしくは増粘もしくは固化処理として、基板又は吐出もしくは供給された試料溶液を冷却するようにしてもよい。冷却は、加熱によって、試料溶液中のDNAが損傷を受ける場合や、試料溶液中の成分が加熱により軟化してしまう場合に好適に採用される。

【0044】また、本発明においては、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、供給位置をずらしながら行うようにしてもよく、供給量を変化させて行うようにしてもよい。即ち、試料溶液の種類に応じて例えば試料溶液を2～100回ほどそれぞれ別の位置に供給して1つのスポット径を形成する。この場合、試料溶液の種類に応じて供給数を変え、更に供給位置を決定することができるため、試料溶液の種類に拘わらず、すべてのスポット径を均一に形成することができ、DNAチップの品質の向上並びに信頼性の向上を図ることができる。

【0045】なお、供給位置をずらしながら1つのスポットを形成することは、従来のピン式スポットでは不可能であり、インクジェット方式で、1滴当たりの供給量をピン式に比して1/100～1/10程度にできることにより、初めて可能になる手法であり、前記乾燥、増粘、固化処理と組み合わせることにより、従来の円形スポット以外のスポット形状を可能とし、DNAチップの読み取り機器（CCD撮像装置等）とのマッチングをとることができる範囲を広げることができるという利点を有する。

【0046】更に、微小滴で供給位置をずらしながら1つのスポットを形成することは、スポットの高さ方向の形状も、その積み重ねる位置を調整することで制御可能であり、スポットから発光される蛍光強度パターンをスポット内で自由に設計することができるという利点を有する。

【0047】また、供給量の変化は、供給数の変化に加え、インクジェット方式の場合、吐出条件、即ち、圧電／電歪素子に印加する電圧パターンの変化でも可能である。

【0048】また、本発明においては、前記試料溶液を前記基板上に供給する際、あるいは供給するに先立って、前記試料溶液に振動を与えることが好ましい。

【0049】この場合、試料溶液に含まれるDNA断片が沈殿することが回避され、試料溶液中にDNA断片を均一に分散させることができる。これにより、各基板に形成される同種の試料溶液について、DNA断片の含有

量のばらつきをほとんどなくすることができ、基板毎の遺伝子解析のばらつきをなくすることができる。

【0050】更にまた、本発明においては、試料溶液を基板上にインクジェット方式で供給して、前記基板上に試料溶液によるスポットが多数配列されたDNAチップを製造するDNAチップの製造方法において、前記試料溶液を前記基板上に供給する際に、前記試料溶液を吐出、供給する箇所の周りの湿度をその他の部分より選択的に高くして、前記試料溶液が乾燥もしくは増粘もしくは固化しないようにしてもよい。これにより、特に、乾燥、増粘、固化しやすい試料溶液を用いる場合に、吐出不良を回避できる。

【0051】また、本発明においては、前記基板上に前記試料溶液が供給されてスポットが多数配列された基板を作製した後に、前記基板を0℃以下に冷却した後、湿度30%以上の十分な体積の気体が存在する室温下に戻す工程を採用してもよい。

【0052】更に、前記基板上に前記試料溶液が供給されてスポットが多数配列された基板を作製した後に、前記基板を、湿度80%以上の十分な体積の気体が存在する雰囲気下にさらしたり、ミストを含んだ水蒸気中にさらしてもよい。

【0053】これらの発明は、ポリマー等を混合させ、粘度を増加させた試料溶液を用い、試料溶液の滴下方法を調整し、基板上のスポットの形状を、例えばスポットの周縁部分が盛り上がり、中央部分が凹んだ、いわゆるドーナツ形状を呈するようにする場合に好適に採用される。

【0054】このようなドーナツ形状の場合、スポットの周縁部分と基板の境界が際立って観測されやすくなり、DNA断片を含む試料溶液のように、無色透明な液体のスポットを、無色透明のガラス基板等の上に形成する場合に、そのスポット形状を観測しやすくなり、スポット形状の良否を検査しやすくなるという利点を有する。

【0055】しかしながら、このようなドーナツ形状を呈したスポットにおいては、多くの場合、その後の固定化時の洗浄工程で周縁の盛り上がり部分の大半が洗い流されたとしても、固定化される実質的な試料は周縁部分で多く（濃く）なることから、DNAチップとして使用したときに、スポットから発せられる蛍光発光量の分布は、スポット内でドーナツ形状を呈することになり、感度の劣化、ばらつきの一因となってしまう。

【0056】従って、検査のしやすさ（ドーナツ形状）と、スポット形状の良さ（非ドーナツ形状）を両立させるためには、基板に試料溶液を供給する際は、インクジェット方式等で吐出し、基板に試料溶液を滴下させ、その運動エネルギーと基板との疎水性の制御で試料溶液を、そのスポットの周縁部分に集中させるようにしてドーナツ形状を形成し、その後、液体の表面張力により球

10

20

30

40

50

状にならない程度に、予め試料溶液の粘度を増加させる一方、検査終了後には、スポットを形成する試料溶液の流動性を増し、表面張力により、ドーナツ形状を非ドーナツ形状に変化させる方法が適している。本発明は、この方法を実現するために好適である。

【0057】即ち、ドーナツ形状のスポットが形成された基板を0℃以下に冷却した後、湿度30%以上の十分な体積の気体が存在する室温下に戻すことや、前記基板を湿度80%以上の十分な体積の気体が存在する雰囲気下にさらしたり、ミストを含んだ水蒸気中にさらしたりすることで、周りの気体から試料溶液中に水分が取り込まれたり、ミストが接触して試料溶液の流動性が増し、スポット形状が非ドーナツ形状である半球状に変化し、もって、DNAチップの感度向上、感度ばらつきの低減が図られることになる。もちろん、スポット形状が、半球状になった後は、速やかに基板を乾燥工程に投入し、形状の固定化を行ってもよい。なお、水蒸気にさらす場合は、水蒸気の温度をDNA断片が変質しない程度の温度以下にしなければならないことはもちろんである。

【0058】

【発明の実施の形態】以下、本発明に係るDNAチップの製造方法のいくつかの実施の形態例を図1～図15を参照しながら説明する。

【0059】本実施の形態に係るDNAチップの製造方法は、図1に示すように、基板10の表面にpoly-L-lysine層12（図10A参照）を形成する前処理工程S1と、DNA断片を含む試料を調製する試料調製工程S2と、得られた試料の濃度を希釈する希釈工程S3と、希釈された試料溶液を基板10上に供給（滴下を含む）して、図3に示すように、基板10上に多数のスポット80が配列されたスポット済み基板を作成する供給工程S4と、基板10に熱を加えてスポット80を乾燥させる乾燥工程S5と、スポット80中のDNA断片を基板10上に固定化する固定化工程S6とからなり、図3に示すDNAチップ20を製造する。

【0060】また、試料調製工程S2は、図2に示すように、DNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する増幅工程S11と、得られたPCR産物を乾燥してDNA粉末とする粉末生成工程S12と、得られたDNA粉末を緩衝液に溶かす混合工程S13とを含む。

【0061】具体的に説明すると、前処理工程S1は、まず、基板10をアルカリ溶液に浸し、室温で少なくとも2時間ゆっくりと振盪する。前記アルカリ溶液は、例えばNaOHを蒸留水に溶かし、更にエタノールを加えて、完全に透明になるまで攪拌した溶液である。

【0062】その後、基板10を取り出して、蒸留水中に移し、リンスして、アルカリ溶液を除去する。次いで、蒸留水中にpoly-L-lysineを加えて調製されたpoly-L-lysine液に基板10を浸し、1時間放置する。

【0063】その後、基板10を取り出して、遠心機に

かけて遠心し、余分なpoly-L-lysine液を除去する。次いで、基板10を40℃、5分ほど乾燥させて、表面にpoly-L-lysine層12が形成された基板10を得る。

【0064】次に、試料調製工程S2は、まず、既知のPCR機で増幅したPCR産物（増幅工程S11）に、3Msodium acetateとイソプロパノールとを加え、数時間放置する。その後、このPCR産物溶液を遠心機で遠心し、DNA断片を沈殿させる。

【0065】沈殿させたDNA断片をエタノールでリンスし、遠心の後、乾燥させてDNA粉末を生成する（粉末生成工程S12）。得られたDNA粉末に緩衝液（例えばTEバッファ溶液）を加え、数時間放置して完全に溶かすことによって（混合工程S13）、試料が調製される。この段階での試料の濃度は1～10μg/μリットルである。

【0066】そして、この実施の形態では、得られた試料の濃度を希釈する（希釈工程S3）。この希釈工程S3では、前記試料を水や塩化ナトリウムを含む水溶液や、ポリマーを含む水溶液等で希釈するようにしている。なお、希釈後の試料溶液は、必要に応じて1時間～数時間放置するか、冷凍－解凍の混合を行って、試料と希釈液とをなじませてよい。その後、前記希釈された試料溶液を遠心分離又は真空脱泡処理して溶液中の泡を取り除いた後、基板10上に供給してスポット済み基板を作成する（供給工程S4）。

【0067】特に、この実施の形態では、供給工程S4に、図4A～図4C及び図5に示すような分注装置30を使用する。

【0068】この分注装置30は、矩形状の固定板32の上面に例えば10個のマикроピペット34を5行2列に配列し、各列方向に整列されたマクロピペット34群をそれぞれ固定治具36を介して固定板32に固定させた構成を有する。

【0069】マクロピペット34は、図4C及び図5に示すように、ほぼ直方体の形状を有する基体50の上面に形成された試料注入口52と、該基体50の下面に形成された試料吐出口54と、内部に試料注入口52と試料吐出口54との間に形成されたキャビティ56と、基体50を振動させたり、キャビティ56の体積を変化させたりするアクチュエータ部58とを有して構成されている。

【0070】従って、図5に示すように、前記固定板32には、マクロピペット34の試料吐出口54に対応する箇所にそれぞれ貫通孔40が設けられている。これにより、マクロピペット34の試料吐出口54から吐出された試料溶液が、前記貫通孔40を通じて、例えば固定板32の下方に固定された基板10に供給されることになる。

【0071】このマクロピペット34は、試料注入口52から基体50の内部にかけて開口幅の大きいほぼし



字状の導入穴60が形成されている。この導入穴60とキャビティ56との間には、径の小さい第1の連通孔62が形成され、試料注入口52から注入された試料溶液が導入穴60及び第1の連通孔62を通じてキャビティ56に導入されるようになっている。

【0072】キャビティ56のうち、前記第1の連通孔62とは異なる位置に、試料吐出口54に連通し、かつ、第1の連通孔62よりも径の大きい第2の連通孔64が形成されている。本実施の形態では、キャビティ56の下面のうち、試料注入口52寄りに第1の連通孔62を形成し、同じくキャビティ56の下面のうち、試料吐出口54に対応した位置に第2の連通孔64を形成するようにしている。

【0073】更に、この実施の形態では、基体50のうち、キャビティ56の上面が接する部分が薄肉とされ、外部応力に対して振動を受けやすい構造となっており、振動部66として機能するようになっている。振動部66の上面に前記アクチュエータ部58が形成されている。

【0074】基体50は、複数枚のジルコニアセラミックスのグリーンシート（第1の薄板層50A、第1のスペーサ層50B、第2の薄板層50C、第2のスペーサ層50D及び第3の薄板層50E）を積層し、一体焼成して構成されている。

【0075】つまり、基体50は、試料注入口52を構成する窓部が形成され、一部において振動部66を構成する薄肉の第1の薄板層50Aと、導入穴60の一部及びキャビティ56を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された厚肉の第1のスペーサ層50Bと、導入穴60の一部、第1の連通孔62及び第2の連通孔64の一部を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された薄肉の第2の薄板層50Cと、導入穴60の一部及び第2の連通孔64の一部を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された厚肉の第2のスペーサ層50Dと、試料吐出口54を構成する窓部が形成された薄肉の第3の薄板層50Eとを積層し、一体焼成して構成されている。

【0076】アクチュエータ部58は、前記振動部66のほか、該振動部66上に直接形成された下部電極70と、該下部電極70上に形成された圧電／電歪素子や反強誘電体等からなる圧電層72と、該圧電層72の上面に形成された上部電極74とを有して構成されている。

【0077】下部電極70と上部電極74は、図4Cに示すように、それぞれ基体50の上面に形成された複数のパッド76及び78を通じて図示しない駆動回路に電気的に接続される。

【0078】上記のような構成のマイクロピペット34によれば、上部電極74と下部電極70との間に電界が生じると、圧電層72が変形し、それに伴って振動部66が変形し、振動部66に接しているキャビティ（加圧室）56の容積が減少又は増加することになる。

【0079】このキャビティ56の容積の減少によってキャビティ56内に充填された試料溶液がキャビティ56に連通する試料吐出口54から所定速度で吐出され、図3に示すように、マイクロピペット34から吐出された試料溶液が顕微鏡スライドガラス等の基板50上にスポット80として整列固定されたDNAチップ20を作製することができる。また、このキャビティ56の容積増加によって、キャビティ56内に第1の連通孔62から新たな試料溶液が注入、充填され、次の吐出に備えられる。

【0080】なお、アクチュエータ部58の駆動によって、キャビティ56の容積が減少する構造としては、いわゆるインクジェット方式の装置構造を採用することができる（特開平6-40030号公報参照）。

【0081】そして、キャビティ（加圧室）56は、DNA断片などを含む試料溶液が乱れの少ない状態下で移動するような流路寸法に形成されている。

【0082】つまり、キャビティ56の寸法は、試料の種類、作成する液滴の大きさ、形成密度により異なるが、例えば、塩基対1〜10000程度のDNA断片を $100\mu\text{g}/\mu\text{リットル}$ 以下の濃度で $\times 1\text{TE}$ バッファ溶液（緩衝液）に溶解させ、更に等量のポリマーを含んだ水溶液と混合させた試料を $50\sim 600\mu\text{m}$ ピッチで $30\sim 500\mu\text{m}\phi$ 液滴径の滴下を行う場合においては、図6に示すように、キャビティ長（L）は、 $1\sim 5\text{mm}$ 、キャビティ幅（W）は、 $0.1\sim 1\text{mm}$ 、キャビティ深さ（D）は、 $0.1\sim 0.5\text{mm}$ が好ましい。またキャビティ56の内壁には、流れを乱す突起物がないように滑らかであることがよく、その材質は、試料溶液と親和性の良いセラミックスからなることが好ましい。

【0083】このような形状にすることにより、キャビティ56を試料注入口52から試料吐出口54に至る流路の一部として、試料注入口52から導入穴60、第1の連通孔62を経てキャビティ56内に移動する試料溶液の流れを乱すことなく試料吐出口54に導くことができる。

【0084】なお、基体50は、前述したように、ジルコニアセラミックスの一体積層、焼成体であるほかに、アクチュエータ部58を形成したジルコニアセラミック焼結体と金属、樹脂フィルム等との接着体であってもよい。特に、試料吐出口54を形成した第3の薄板層50Eは、その加工法とのマッチングを考慮して、PETフィルム等の有機樹脂をエキシマレーザ等で加工したシート、あるいはステンレスフィルム等の金属を金型等で打ち抜いたシートであることが好ましい。

【0085】また、試料吐出口54と第1の連結孔62の寸法は、吐出する試料溶液の物性、吐出量、吐出速度等によって最適設計がなされるが、 $10\sim 100\mu\text{m}\phi$ 程度であることがよい。

【0086】図7は、1つの試料注入口52とそれに連

結する導入穴60に対し、2つの第1の連結孔62が連通し、それぞれの連結孔62には、キャビティ56、第2の連結孔64及び試料吐出口54が連続して形成された流路65がそれぞれ独立して2つ形成されている。各キャビティ56の上面には、それぞれ独立して配線、駆動するアクチュエータ部58（図示せず）が形成される。このような構成のマイクロピペット34によれば、同一の試料溶液を同時に、又はタイミングをずらして基板10上に供給することができる。

【0087】ところで、図4Aに示すように、固定板32の上面には、マイクロピペット34を位置決め固定するための複数のピン38が設けられている。マイクロピペット34を固定板32上に固定する場合は、マイクロピペット34の基体50の両側に設けられた位置決め用孔90（図4C参照）に固定板32のピン38を挿入させながら、マイクロピペット34を固定板32に載置することで、自動的に複数のマイクロピペット34が所定の並びで配列位置決めされることになる。

【0088】また、各固定治具36は、複数のマイクロピペット34を固定板32に押さえ付ける押さえ板100を有する。押さえ板100の両端には、それぞれネジ102が挿通される挿通孔が形成され、この挿通孔にネジ102を挿通して、固定板32にねじ込むことによって、前記押さえ板100で複数のマイクロピペット34を一度に固定板32に押さえ付けることができるようになっている。そして、1つの押さえ板100で押さえ付けた複数のマイクロピペット34で1つのユニットが構成される。図4Aの例では列方向に配列された5つのマイクロピペット34で1つのユニットが構成された例を示している。

【0089】また、押さえ板100には、複数のマイクロピペット34を押さえ付けたときに、各マイクロピペット34の試料注入口52に対応する箇所にそれぞれ試料溶液を供給するための導入孔104（図4B参照）が形成されており、各導入孔104の上端部にはそれぞれ試料溶液を導入孔104に導くためのチューブ106が保持されている。

【0090】なお、押さえ板100の幅は、配線作業の効率化を考慮すると、複数のマイクロピペット34を固定板32に押さえ付けた際に、アクチュエータ部58の各電極70及び74につながるパッド76及び78が上方に臨むような寸法であることが好ましい。

【0091】このように、上述の分注装置30は、試料注入口52及び試料吐出口54を有するマイクロピペット34の複数個をそれぞれ試料吐出口54を下方向に向けた状態で立設させて構成されている。

【0092】即ち、各マイクロピペット34は、それぞれの試料注入口52を上側とし、試料吐出口54を下側とし、かつ、各試料吐出口54が縦横に配列配置されて、試料吐出口54からそれぞれ種類の異なる試料溶液

が吐出されるようになっている。

【0093】このような構成を有する分注装置30において、各試料注入口52に対応してそれぞれ種類の異なる試料溶液を供給する方法としては、図8に示すように、例えば多数の断面ほぼV字状の凹部（溜め部）110が配列されたカートリッジ112を使用する方法がある。この方法は、カートリッジ112の各凹部110にそれぞれ種類の異なる試料溶液を入れ、該カートリッジ112を各凹部110とチューブ106とがそれぞれ対応するように取り付け、針等で各凹部110の底を開封することによって、各凹部110にあった試料溶液をチューブ106を介して各マイクロピペット34に供給する方法等が考えられる。

【0094】また、チューブ106を用いない場合は、カートリッジ112を各凹部110と固定治具36の各導入孔104とがそれぞれ対応するように取り付け、針等で各凹部110の底を開封することによって、各凹部110にあった試料溶液を導入孔104を介して各マイクロピペット34に供給する方法のほか、予め、固定治具36における各導入孔104の近傍に針等を形成し、カートリッジ112を固定治具36に取り付けると同時に各凹部110が開封されるようにしてもよい。

【0095】なお、開封後に気体等を圧送し、試料溶液を強制的に押し出す機構を加えてもよい。また、各マイクロピペット34の基体50内に形成された試料注入口52から試料吐出口54に至る空間を洗浄する機構を備えることは、数千から数万種類という多種類のDNA断片などを汚染なく、しかも純度よくスポット80として吐出するために望ましい。

【0096】図4Aの例では、押さえ板100の両端をネジ102で固定板32に締め付けることで行っているが、押さえ板100の固定法は、ネジ、バネ等で機械的に行うほか、接着剤等で行ってもよい。

【0097】また、マイクロピペット34を構成する基体50は、上述したように、セラミックスで形成されており、例えば、安定化ジルコニアや部分安定化ジルコニア、アルミナ、マグネシア、窒化珪素等を用いることができる。

【0098】このうち、安定化／部分安定化ジルコニアは、薄板においても機械的強度が大きいこと、韌性が高いこと、圧電層72や電極材との反応性が小さいことから最も好適に採用される。

【0099】そして、基体50等の材料として安定化／部分安定化ジルコニアを使用する場合には、少なくとも、アクチュエータ部58が形成される部分（振動部66）には、アルミナあるいはチタニア等の添加物が含有されることが好ましい。

【0100】また、アクチュエータ部58を構成する圧電層72は、圧電セラミックスとして、例えば、ジルコン酸鉛、チタン酸鉛、マグネシウムニオブ酸鉛、マグネ

10

20

30

40

50

シウムタンタル酸鉛、ニッケルニオブ酸鉛、亜鉛ニオブ酸鉛、マンガンニオブ酸鉛、アンチモンズ酸鉛、マンガントングステン酸鉛、コバルトニオブ酸鉛、チタン酸バリウム等やこれらのいずれかを組み合わせた成分を含有する複合セラミックスを用いることができるが、本実施の形態においては、ジルコン酸鉛とチタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛からなる成分を主成分とする材料が好適に用いられる。

【0101】これは、このような材料が、高い電気機械結合係数と圧電定数を有することに加え、圧電層 72 の焼結時における基体材料との反応性が小さく、所定の組成のものを安定に形成することができるに基づくからである。

【0102】更に、本実施の形態では、前記圧電セラミックスに、ランタン、カルシウム、ストロンチウム、モリブデン、タングステン、バリウム、ニオブ、亜鉛、ニッケル、マンガン、セリウム、カドミウム、クロム、コバルト、アンチモン、鉄、イットリウム、タンタル、リチウム、ビスマス、スズ等の酸化物、もしくはこれらいずれかの組合せ、又は他の化合物を適宜、添加したセラミックスを用いてもよい。

【0103】例えば、ジルコン酸鉛とチタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛を主成分とし、これにランタンやストロンチウムを含有するセラミックスを用いることもまた好ましい。

【0104】一方、アクチュエータ部 58 における上部電極 74 及び下部電極 70 は、室温で、固体であって導電性の金属で構成されていることが好ましく、例えば、アルミニウム、チタン、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、パラジウム、ロジウム、銀、スズ、タンタル、タングステン、イリジウム、白金、金、鉛等の金属単体あるいはこれらのいずれかを組み合わせた合金が用いられ、更に、これらに圧電層 72 や基体 50 と同じ材料を分散させたサーメット材料を用いてもよい。

【0105】次に、この実施の形態では、上記のような分注装置 30 を用い、試料溶液を基板 10 上に供給したスポット 80 を乾燥させた（乾燥工程 S5）後、120 mJ の UV 照射、NaBr 液中への 20 分浸漬（ブロッッキング処理）、煮沸 2 分、エタノール置換（脱水）を行って、DNA 断片を基板 10 上に固定化して（固定化工程 S6）、DNA チップ 20 を製造する。

【0106】次に、この分注装置 30 を使って基板 10 上に試料溶液を供給し、スポット 80 を形成するいくつかの方法について図 9～図 15 を参照しながら説明する。

【0107】まず、第 1 の方法は、図 9 に示すように、各チューブ 106 からそれぞれ固定治具 36 の導入孔 104 を介して各マイクロピペット 34 のキャビティ 56

内にそれぞれ種類の異なる試料溶液（希釈済み）を充填し、次いで、各アクチュエータ部 58 を駆動して、各マイクロピペット 34 の試料吐出口 54 から試料溶液を吐出させる。

【0108】ここで、アクチュエータ部 58 の各電極 70 及び 74 に印加する電圧波形のうち、アクチュエータ部 58 がオン動作して、キャビティ 56 の容積を減少させる場合、各電極 70 及び 74 にはパルス的な電圧が印加されることになる。この場合、パルスの振幅（電圧）、単位時間当たりの変化量（電圧波形の立ち上がり角度）、パルス幅等を変化させることで、振動部 66 の変形量、変形速度等が変化し、これにより、試料溶液の吐出量が制御できる。また、一定期間に発生させるパルス数を変化させることで、単位時間当たりの試料溶液の滴下回数を変更することができる。

【0109】試料溶液を複数回供給して 1 つのスポット 80 を形成する場合、通常、供給位置を固定して、供給回数を重ねるが、供給毎に供給位置をずらしてもよい。例えば図 10A 及び図 10B に示すように、試料溶液の供給位置を適宜変えることによって、形成されるべき 1 つのスポット 80（二点鎖線で示す）内に複数の試料溶液による微小スポット 80a が形成され、これら微小スポット 80a が基板 10 上で組み合わせられることで（合体）、図 11A 及び図 11B に示すように、1 つのスポット 80 が形成されることになる。この場合、供給する試料溶液の種類に応じて、供給回数、供給位置及び 1 回の供給量を制御することで、基板 10 上に形成される各スポット 80 の径の均一化を図ることができる。

【0110】更に、この実施の形態では、試料溶液を基板 10 上に供給する際に、図 12A～図 13 に示すように、該試料溶液の部分を乾燥、増粘、固化するようにしている。この処理は、例えば基板 10 を加熱することで実現できる。

【0111】基板 10 を加熱する方法としては、図 13 に示すように、赤外線ランプ 122 から出射された赤外線を基板 10 の裏面に照射して加熱する方法がある。また、試料溶液を直接加熱する方法としては、図 12A、図 12B に示すように、レーザ光源 120、電磁波発生源 121 から出射されたレーザ光 L、電磁波 E を、試料溶液に焦点を合わせて照射、加熱する方法がある。試料溶液は、基板 10 上に供給された状態で加熱してもよいが、供給の際の形状の安定性、スポット 80 の広がり防止の観点から、試料吐出口 54 から吐出されて、基板 10 上に落下する間に、照射、加熱することが望ましい。

【0112】また、電磁波 E は、試料溶液のように、水分を含んだものを選択的に加熱できるため、スポット 80 を形成する試料溶液（供給中の試料溶液）のみを加熱でき、より好ましい。なお、加熱に際しては、吐出を終えた試料吐出口 54 は、乾燥による吐出不良を回避するため、金属シールド板等で遮蔽してもよい。

10

20

30

40

50

【0113】更にまた、この実施の形態では、試料溶液を基板10上に供給する際に、試料溶液及び基板10を冷却するようにしている。冷却方法は、試料溶液が供給される基板10を予め室温以下に冷却しておいてもよいし、試料溶液自体に、代替フロンや液体窒素等からなる冷却剤をふきかけてもよい。但し、このような冷却処理は、冷却に際し、周りの気体からの水分の露結による水滴の付着が起り、スポット80自体を流してしまうおそれがあるため、周りの気体の湿度管理、冷却、常温復帰の速度管理等が必要である。

【0114】また、キャビティ56に試料溶液を充填した後に、アクチュエータ部58に振動を励起する程度の電圧を印加することが好ましい。これにより、キャビティ内に充填された試料溶液に含まれるDNA断片が均一に分散され、滴下毎のDNA断片の量にばらつきは生じなくなる。

【0115】次に、分注装置30を使った第2の方法について説明する。この第2の方法は、図14に示すように、各チューブ106からそれぞれ固定治具36の導入孔104を介して各マイクロピペット34のキャビティ56内に精製水や緩衝液などの置換液を充填し、次いで、予め希釈した試料を試料注入口52からキャビティ56内に置換させながら注入する。そして、アクチュエータ部58を駆動させて、試料溶液を基板10上に吐出供給させる。なお、置換液と試料溶液の間に、試料溶液と比重をほぼ同じくするDNA断片を含まない中間液（例えば、緩衝液とポリマーを含んだ水溶液の混合液）を介してもよい。

【0116】キャビティ56内における試料の層流置換の完了は、キャビティ56内の流体特性の変化を検知することにより把握することが好ましい。

【0117】なお、キャビティ56内の置換液と試料の置換は層流で行われることが好ましいが、試料の種類が変わった場合や、液体の移動速度が非常に速い場合においては、キャビティ56のうち、第1の連通孔62の近辺部分は、必ずしも層流でなくてもよい。この場合、試料溶液と置換液の混合により試料溶液のページ量は増大するが、キャビティ56内の流体特性の変化を検知することにより置換完了を判断することで、ページ量の増大を最小にできる。

【0118】ここで、キャビティ56内の流体特性の変化は、アクチュエータ部58に振動を励起する程度の電圧を印加し、その振動に伴う電気的定数の変化を検出することにより把握する。このような流体特性の変化の検知は、例えば、特開平8-201265号公報に記載されており、この内容が参照できる。

【0119】具体的には、アクチュエータ部58に対して、所定の間隔で、吐出駆動用の電源からの電気的接続をリレーで切り離し、同時に、共振周波数を測定する手段をリレーにより接続し、その時点でのインピーダンス

あるいは共振周波数を電気的に測定する。

【0120】これにより、液体の粘度、比重等が目的の試料（DNA断片などを含む液体）であるかどうかを把握することができる。即ち、各マイクロピペット34においては、マイクロピペット34自体がセンサとして機能するため、マイクロピペット34の構成も単純化することができる。

【0121】そして、前記置換が済んだ後、アクチュエータ部58を、求められるスポット径に応じた液適量に対応した駆動条件にて駆動し、試料溶液の基板10上への供給を繰り返すことにより、DNAチップ20を製造する。通常、1つのスポット80を形成するのに、マイクロピペット34から1～数百滴を吐出して行う。

【0122】なお、試料注入口52中の試料の量が減少したら、緩衝液や精製水や塩化ナトリウムを含む水溶液を追加して、流路中に気泡が入らないようにし、吐出を続けることにより、試料溶液をマイクロピペット34内に残すことなく使い切ることができる。試料から置換液への置換の完了（試料吐出の終了）は、同じく、アクチュエータ部58を用いた液体の粘度、比重の検出で行う。

【0123】また、使用する置換液、中間液、試料溶液としては、予め脱気操作を通して溶液中の溶存気体を取り除いたものを使用することが好ましい。そのような溶液を用いることにより、マイクロピペット34の流路内に試料溶液を充填する際に、流路途中で気泡がひっかかってしまい、充填の不備が生じた場合でも、その気泡を試料溶液中に溶かし込んで不具合を回避できると共に、吐出の途中において、流体中に気泡が発生することがなく、吐出の不具合を生じることもない。

【0124】また、上述の第2の方法において、試料溶液を吐出しつつ、緩衝液や精製水や塩化ナトリウムを含む水溶液のような置換液を試料注入口52からキャビティに注入し、同様に、層流置換によりキャビティ56内に残留する試料溶液を完全に吐出し、次の試料注入に備えることができる。

【0125】そして、キャビティ56内に試料溶液が残留しているかどうか（試料溶液として吐出できるかどうか）を検知するのにも、同じく、キャビティ56内の流体特性の変化を検知することにより把握できる。この場合、層流置換あるいは置換完了検出機構により使用に供しない試料のページ量を極めて少なくすることができる。と共に、試料溶液の使用効率を向上することができる。

【0126】また、試料を試料注入口52からキャビティ56に充填する際に、アクチュエータ部58を駆動させながら試料を試料注入口52からキャビティ56内に層流置換させてもよい。この場合、予め安価な置換液によりキャビティ56内を確実に置換後、高価な試料を層流置換することにより、吐出不良の発生が完全に防止でき、高価な試料溶液を効率よく吐出できる。

10

20

30

40

50

【0127】次いで、前記試料溶液が供給された基板10上のスポット80の厚みの形状が、図15に示すように、周縁部分130で盛り上がった、いわゆるドーナツ形状になった場合は、基板10を0℃に冷却した後、湿度30%以上の十分な体積の気体が存在する室温下に戻す処理を行う。こうすることで、ドーナツ形状になったスポット80に水分が供給され、スポット80中の試料溶液の流動性が増し、表面張力により半球状に変化し、周縁部分130の盛り上がりがなくなる。

【0128】ドーナツ形状の場合、スポット80の周縁部分130と基板10の境界が際立って観測されやすくなり、DNA断片を含む試料溶液のように、無色透明な液体のスポット80を、無色透明のガラス基板等の上に形成する場合に、そのスポット形状を観測しやすくなり、スポット形成の良否を検査しやすくなるという利点を有する。

【0129】しかしながら、このようなドーナツ形状を呈したスポット80においては、多くの場合、その後の固定化時の洗浄工程において、前記周縁部分130（盛り上がり部分）の大半が洗い流されたとしても、固定化される実質的な試料132は周縁部分130で多く（濃く）なることから、DNAチップ20として使用したときに、スポット80から発せられる蛍光発光量の分布は、スポット80内でドーナツ形状を呈することになり、感度の劣化、ばらつきの一因となってしまう。

【0130】従って、検査のしやすさ（ドーナツ形状）と、スポット形状の良さ（非ドーナツ形状）を両立させるためには、基板10に試料溶液を供給する際に、インクジェット方式等で吐出して、基板10に試料溶液を供給し、その運動エネルギーと基板10との疎水性の制御によって、試料溶液を、そのスポット80の周縁部分130に集中させるようにしてドーナツ形状を形成する。

【0131】その後、液体の表面張力により球状にならない程度に、予め試料溶液の粘度を増加させる一方、検査終了後には、スポット80を形成する試料溶液の流動性を増すようにして、表面張力により、ドーナツ形状を非ドーナツ形状に変化させる方法が適している。

【0132】本実施の形態に係る方法（基板10を0℃に冷却した後、湿度30%以上の十分な体積の気体が存在する室温下に戻す処理）は、上述の方法を簡単に実現することができる。

【0133】そして、スポット80への水分の供給は、ミスト等を含む蒸気を直接あてるようにしてもよいが、前記冷却後、室温に戻す工程で、基板10上に露結する水分を利用することが、過剰水分でスポットを流してしまうことなく、また、均一に細かい水滴が供給される点で好ましい。

【0134】その後、基板10を80℃で1時間ベークすることにより、スポット80を乾燥させる。80℃で1時間ベークした後に、冷却→室温に戻す工程を施して

もよいが、その場合は、再度ベーク処理が必要となる。

【0135】このように、本実施の形態に係るDNAチップの製造方法においては、試料溶液の基板10上への供給に先立って、試料溶液の濃度を希釈するようにしているため、該試料溶液を基板10上に供給したとき、図11Aに示すように、試料溶液によるスポット80は半球状にはならず、平坦な形状となる。この場合、供給された試料溶液のほとんどが固定化されるため、その後の洗浄工程でも試料溶液の大半以上が流されてしまうということがなく、試料溶液の使用効率を向上させることができる。

【0136】また、試料溶液に含まれるDNA断片の種類に応じて希釈の度合いを変えて、試料溶液の粘度や表面張力を変化させることにより、基板10上に形成されるスポット80の径を均一化させることができる。

【0137】更にまた、基板10上に試料溶液を供給してスポット80を形成した後、該スポット80に水分を供給する工程を付加することにより、スポット80の厚み方向の形状を更に均一にすることができる。

【0138】このように、本実施の形態においては、コストの高い試料溶液の使用効率を向上させることができ、DNAチップ20の生産性の向上及び歩留まりの向上を図ることができる。また、供給する試料溶液の種類に応じた供給制御を行うことができ、基板10上に形成されるスポット径の均一化を図ることができ、DNAチップ20の品質並びに信頼性の向上を図ることができる。

【0139】なお、この発明に係るDNAチップの製造方法は、上述の実施の形態に限らず、この発明の要旨を逸脱することなく、種々の構成を採り得ることはもちろんである。

【0140】

【発明の効果】以上説明したように、本発明に係るDNAの製造方法によれば、コストの高い試料溶液の使用効率を向上させることができ、DNAチップの生産性の向上及び歩留まりの向上を図ることができる。また、滴下する試料溶液の種類に応じた滴下制御を行うことができ、基板上に形成されるスポット径の均一化を図ることができ、DNAチップの品質並びに信頼性の向上を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本実施の形態に係るDNAチップの製造方法を示す工程ブロック図である。

【図2】試料調製工程の内訳を示す工程ブロック図である。

【図3】製造されるDNAチップを示す斜視図である。

【図4】図4Aは本実施の形態に係るDNAチップの製造方法で使用される分注装置の構成を示す平面図であり、図4Bはその正面図であり、図4Cは、分注装置を構成する1つのマイクロピペットを示す拡大平面図であ

る。

【図5】マイクロピペットの構成を示す縦断面図である。

【図6】マイクロピペットの基体内に形成されるキャビティを含む流路の形状を示す斜視図である。

【図7】マイクロピペットの基体内に形成されるキャビティを含む流路の他の形状を示す斜視図である。

【図8】カートリッジと共に示す分注装置の分解斜視図である。

【図9】分注装置を使用してDNAチップを製造する場合の第1の方法を示す説明図である。

【図10】図10Aは基板上に試料溶液を供給して、形成されるべき1つのスポット内に多数の微小スポットが形成されていく過程を示す断面図であり、図10Bはその平面図である。

【図11】図11Aは基板上において、多数の微小スポットが合体して1つのスポットが形成された状態を示す断面図であり、図11Bはその平面図である。

【図12】図12Aは試料溶液又は基板を加熱する方法の一例を示す説明図であり、図12Bはその他の方法を示す説明図である。

【図13】基板を加熱する方法の一例を示す説明図である。

【図14】分注装置を使用してDNAチップを製造する＊

＊ 場合の第2の方法を示す説明図である。

【図15】ドーナツ形状のスポットの例を示す断面図である。

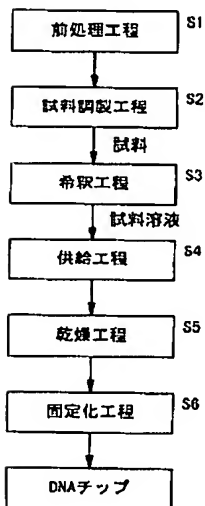
【図16】従来例に係るDNAチップの製造方法によって基板上に形成されたスポットの形状を示す断面図である。

【符号の説明】

10…基板	20…DNAチップ
30…分注装置	34…マイクロピペット
50…基体	52…試料注入口
54…試料吐出口	56…キャビティ
58…アクチュエータ部	80…スポット
80a…微小スポット	112…カートリッジ
120…レーザ光源	122…赤外線ランプ
S1…前処理工程	S2…試料調製工程
S3…希釈工程	S4…供給工程
S5…乾燥工程	S6…固定化工程
S11…増幅工程	S12…粉末生成工程
S13…混合工程	S14…試料調製工程
	S15…乾燥工程
	S16…固定化工程
	S17…粉末生成工程
	S18…混合工程

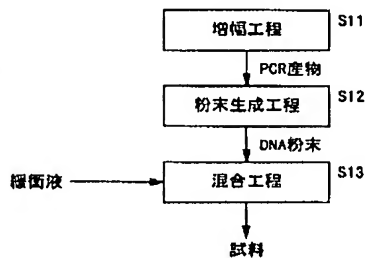
【図1】

FIG. 1



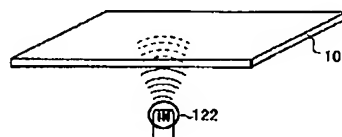
【図2】

FIG. 2



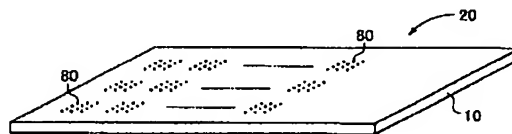
【図3】

FIG. 13



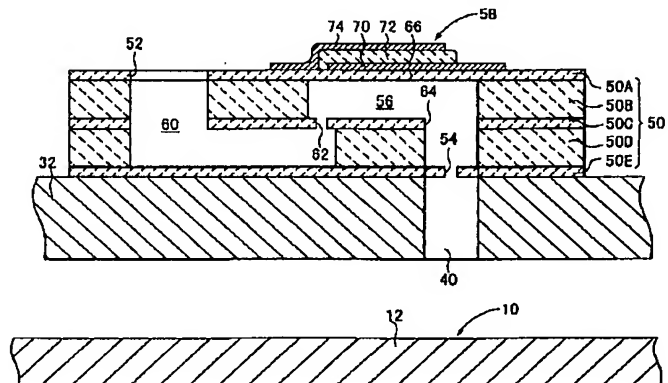
【図3】

FIG. 3



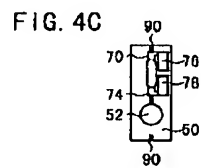
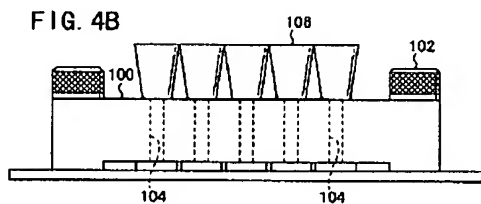
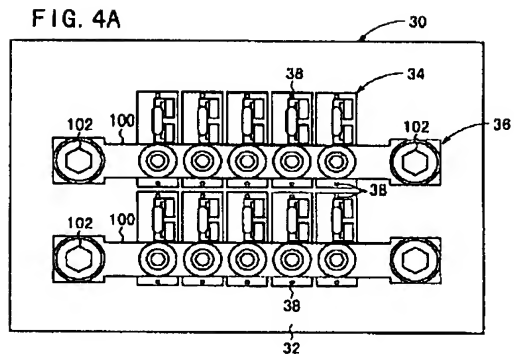
【図5】

FIG. 5

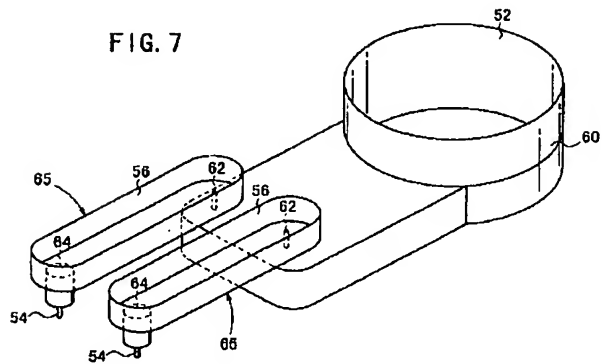




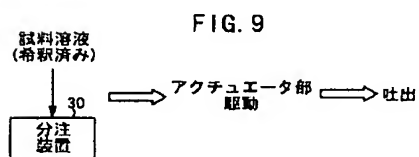
【図4】



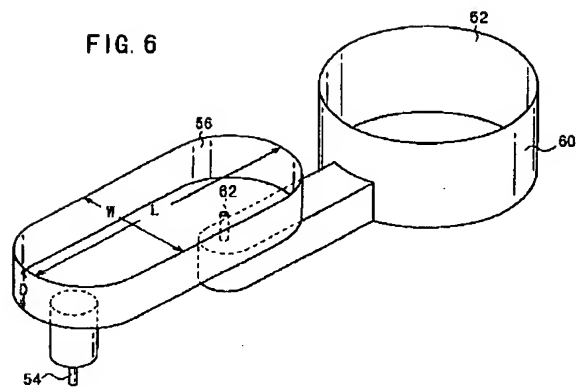
【図7】



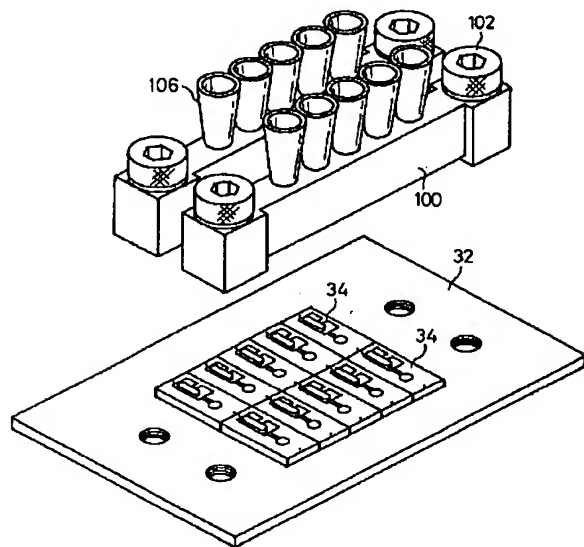
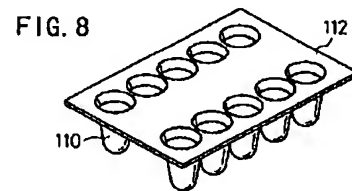
【図9】



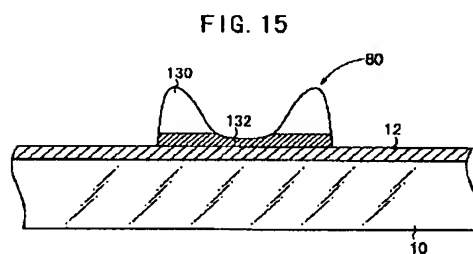
【図6】



【図8】

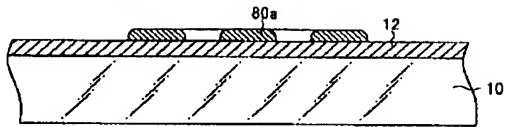


【図15】



【図10】

FIG. 10A



【図11】

FIG. 11A

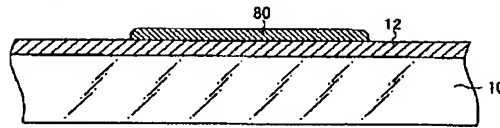


FIG. 10B

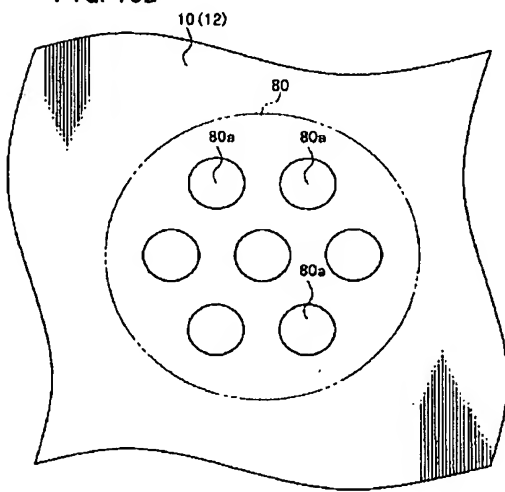
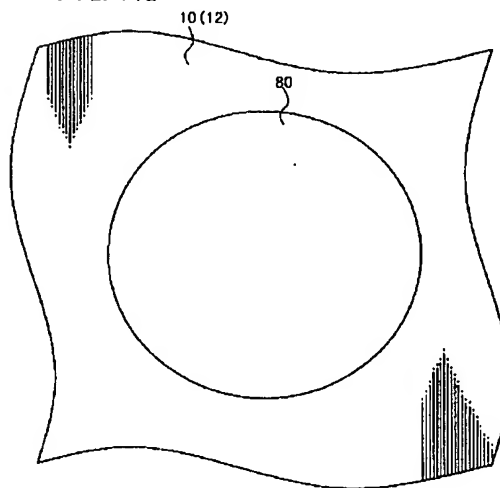


FIG. 11B



【図12】

FIG. 12A

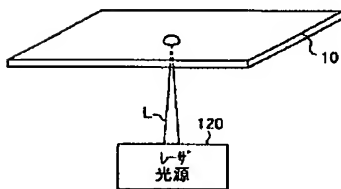
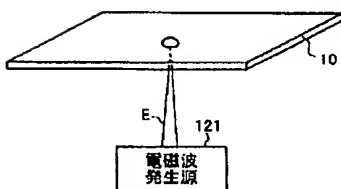
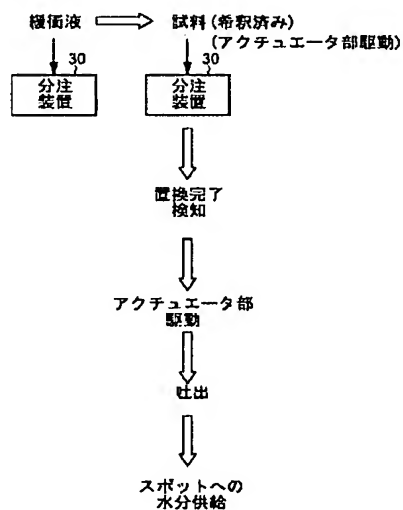


FIG. 12B



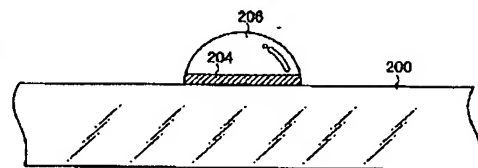
【図14】

FIG. 14



【図16】

FIG. 16



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	タームコード (参考)
G O I N 35/10		G O I N 35/06	D
(72)発明者 武内 幸久 愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番56号 日 本碍子株式会社内		F ターム (参考) 2G058 BA01 BA08 BB02 BB03 BB05 BB12 BB23 CC09 EA14 EB00 ED15 ED20 ED32	
(72)発明者 大西 孝生 愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番56号 日 本碍子株式会社内			
		4B024 AA11 CA09 HA14 4B029 AA07 AA08 BB20 CC03 CC08 FA12 FA15 GA08 GB05 4B063 QA01 QQ42 QR08 QR62 QR84 QS25 QS34 QS39 4G057 AB11 AB12 AB34 AB37 AB39	

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-186880

(43)Date of publication of application : 10.07.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
B01L 3/02  
C12M 1/00  
C12Q 1/68  
G01N 35/10

(21)Application number : 2000-069285

(71)Applicant : NGK INSULATORS LTD

(22)Date of filing : 13.03.2000

(72)Inventor : HIROTA JUICHI  
TAKAHASHI NOBUO  
TAKEUCHI YUKIHISA  
ONISHI KOSEI

(30)Priority

Priority number : 11301627 Priority date : 22.10.1999 Priority country : JP

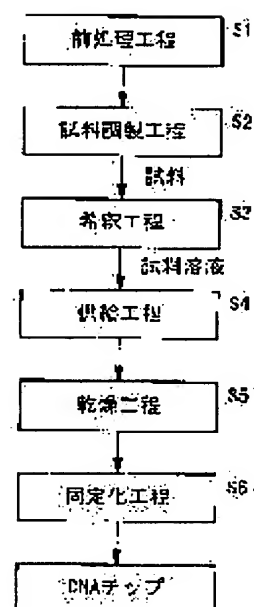
## (54) METHOD FOR PRODUCING DNA CHIP

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To aim at the improvement of productivity and yield of a DNA chip by improving the efficiency in use of a specimen solution having a high cost.

**SOLUTION:** This method for producing the DNA chip comprises a pre- treating process S1 for forming a poly-L-lysine layer on the surface of its base substrate, a specimen-preparing process S2 for preparing the specimen containing the DNA fragments, a diluting process S3 for diluting the concentration of the prepared specimen and a supplying process S4 for producing the DNA chip by supplying the diluted specimen solution on the base substrate. The above specimen-preparing process S2 comprises an amplifying process for preparing a PCR product by PCR-amplifying the DNA fragment, a powder-producing process for drying the obtained PCR product to make DNA powder and a mixing process for dissolving the DNA powder in a buffer solution.

FIG. 1



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.08.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacture approach of the DNA chip characterized by supplying the sample solution on a substrate and carrying out multiple-times supply of said sample solution about the same spot in the manufacture approach of the DNA chip which manufactures the DNA chip by which many spots by the sample solution were arranged on said substrate.

[Claim 2] The manufacture approach of the DNA chip characterized by supplying said sample solution by the ink jet method in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 1.

[Claim 3] It is the manufacture approach of the DNA chip characterized by the sample in which said sample solution contains a DNA fragment in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 1 or 2 being diluted by predetermined concentration.

[Claim 4] It is the manufacture approach of the DNA chip characterized by diluting with the water solution in which the sample in which said sample solution contains said DNA fragment in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 3 contains water or a sodium chloride.

[Claim 5] It is the manufacture approach of the DNA chip characterized by diluting with the water solution in which said sample solution contains a polymer in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 3 or 4.

[Claim 6] It is the manufacture approach of the DNA chip characterized by the concentration of extent with which it is satisfied of the last request base pair per one spot with supply of multiple times [ on the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 3-5 and as opposed to said same spot in said sample solution ] diluting.

[Claim 7] The sample which contains said DNA fragment in any 1 term of claims 1-6 in the manufacture approach of the DNA chip a publication is the manufacture approach of the DNA chip characterized by stepping on the process which carries out PCR magnification of said DNA fragment, and prepares an PCR product, the process which dries said PCR product and is used as DNA powder, and the process which melts said DNA powder to the buffer solution, and being prepared.

[Claim 8] In the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-7 The inlet for pouring said sample solution into at least one or more bases from the exterior, in case said sample solution is supplied on said substrate, The cavity with which said sample solution is poured in and filled up, and the delivery which carries out the regurgitation of said sample solution are formed. At least 1 wall surface of said base which forms said cavity is equipped with piezo-electricity / electrostriction component. The manufacture approach of the DNA chip characterized by using the distributive-pouring equipment with which the sample solution of a class which two or more arrays of the micropipette constituted so that said sample solution might move into said cavity are carried out, and is constituted, and is different from the delivery of each micropipette, respectively is breathed out.

[Claim 9] In the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-7 The inlet for pouring said sample solution into at least one or more bases from the exterior, in case said sample solution is supplied on said substrate, The cavity with which said sample solution is poured in and filled up, and the delivery which carries out the regurgitation of said sample solution are formed. Two or more arrays are carried out and the micropipette constituted so that said sample might move into said cavity is constituted. And the manufacture approach of the DNA chip characterized by breathing out the sample solution of the same class from at least two or more deliveries, and using one distributive-pouring equipment which carries out spot formation.

[Claim 10] The manufacture approach of the DNA chip characterized by the number of the inlets which



are open for free passage to the cavity which said at least two or more deliveries where said same kind of sample solution is breathed out connect in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 9 being one.

[Claim 11] The manufacture approach of the DNA chip characterized by carrying out the regurgitation of said same kind of sample solution almost simultaneous from said at least two or more deliveries in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 9 or 10.

[Claim 12] The manufacture approach of the DNA chip characterized by shifting regurgitation timing and carrying out the regurgitation of said same kind of sample solution from said at least two or more deliveries in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 9 or 10, respectively.

[Claim 13] It is the manufacture approach of the DNA chip characterized by being constituted so that said sample solution may move a micropipette by the laminar flow into said cavity in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 8-12.

[Claim 14] In the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 8-13 In case said sample solution is supplied on said substrate, after pouring in the sample solution from which a class differs, respectively from said inlet corresponding to said delivery which carries out the regurgitation of the sample solution from which a class differs, respectively into said two or more cavities, The manufacture approach of the DNA chip characterized by making the sample solution from which the class in said two or more cavities differs by making said piezo-electricity / electrostriction component drive breathe out from said delivery.

[Claim 15] In the manufacture approach of a DNA chip according to claim 8, in case said sample solution is supplied on said substrate, it is beforehand filled up with a displacing solution in said two or more cavities. Subsequently The manufacture approach of the DNA chip characterized by making the sample solution of the class from which it differs in said two or more cavities by making said piezo-electricity / electrostriction component drive breathe out from said delivery after pouring in making the sample solution from which a class differs permute within said two or more cavities from said inlet.

[Claim 16] The manufacture approach of the DNA chip characterized by pouring in making the sample solution from which a class differs while it is beforehand filled up with a displacing solution in said two or more cavities and said piezo-electricity / electrostriction component are made to drive in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 15 permute within said two or more cavities from said inlet.

[Claim 17] The manufacture approach of the DNA chip characterized by setting to the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 14-16, and grasping the impregnation or the completion of a permutation of the sample solution in said two or more cavities by detecting change of the fluid characteristic in said cavity.

[Claim 18] The manufacture approach of the DNA chip characterized by carrying out degassing processing of said displacing solution in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 15-17.

[Claim 19] In the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 15-18, it is beforehand filled up with a displacing solution in said two or more cavities. Subsequently After pouring in making the medium liquid which does not contain the DNA fragment which makes said sample solution and specific gravity almost the same permute within said cavity from said inlet, The manufacture approach of the DNA chip characterized by making the sample solution of the class from which it differs in said two or more cavities by pouring in the sample solution from which a class differs into said cavity from said inlet, and making said piezo-electricity / electrostriction component drive breathe out from said delivery.

[Claim 20] The manufacture approach of the DNA chip characterized for said sample solution by desiccation or carrying out, making it thicken or solidify at least in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-19 in case said sample solution is supplied on said substrate.

[Claim 21] The manufacture approach of the DNA chip characterized by heating said substrate as said desiccation, thickening, or solidification in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 20.

[Claim 22] The manufacture approach of the DNA chip characterized by heating the regurgitation or said supplied sample solution as said desiccation, thickening, or solidification in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 20.

[Claim 23] The manufacture approach of the DNA chip characterized by using a laser beam for any 1 term of claims 20-22 as said desiccation, thickening, or solidification in the manufacture approach of the

DNA chip a publication.

[Claim 24] The manufacture approach of the DNA chip characterized by using infrared radiation for any 1 term of claims 20-22 as said desiccation, thickening, or solidification in the manufacture approach of the DNA chip a publication.

[Claim 25] The manufacture approach of the DNA chip characterized by using an electromagnetic wave for any 1 term of claims 20-22 as said desiccation, thickening, or solidification in the manufacture approach of the DNA chip a publication.

[Claim 26] The manufacture approach of the DNA chip characterized by cooling a substrate, the regurgitation, or said supplied sample solution as said desiccation, thickening, or solidification in the manufacture approach of a DNA chip according to claim 20.

[Claim 27] The manufacture approach of the DNA chip characterized by supplying shifting a supply location and forming one spot in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-26 in case said sample solution is supplied on said substrate.

[Claim 28] The manufacture approach of the DNA chip characterized by changing the amount of supply, supplying and forming one spot in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-27 in case said sample solution is supplied on said substrate.

[Claim 29] The manufacture approach of the DNA chip characterized by the thing which supply said sample solution on said substrate, and for which it precedes supplying in the case and an oscillation is given to said sample solution in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-28.

[Claim 30] The manufacture approach of the DNA chip which supplies the sample solution by the ink-jet method on a substrate, makes selectively surrounding humidity of the regurgitation [ said sample solution ] and the part to supply higher than other parts in case said sample solution is supplied on said substrate in the manufacture approach of the DNA chip which manufactures the DNA chip by which many spots by said sample solution were arranged on said substrate, and is characterized for said sample solution by making it desiccation or not thicken or solidify.

[Claim 31] The manufacture approach of the DNA chip characterized by including the process returned to the bottom of the room temperature in which the gas of sufficient volume of 30% or more of humidity exists after producing the substrate with which said sample solution was supplied on said substrate, and many spots were arranged in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-30 and cooling said substrate at 0 degree C or less.

[Claim 32] The manufacture approach of the DNA chip characterized by including the process which exposes said substrate to the bottom of the ambient atmosphere in which the gas of sufficient volume of 80% or more of humidity exists after producing the substrate with which said sample solution was supplied on said substrate, and many spots were arranged in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-30.

[Claim 33] The manufacture approach of the DNA chip characterized by including the process which exposes said substrate into a steam including Myst after producing the substrate with which said sample solution was supplied on said substrate, and many spots were arranged in the manufacture approach of a DNA chip given in any 1 term of claims 1-30.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the manufacture approach of the DNA chip (DNA microarray) which made high density carry out alignment immobilization of the DNA fragment of thousands to 10,000 or more kinds of different classes as a spot on substrates, such as a microscope slide glass.

[0002]

[Description of the Prior Art] There is a remarkable thing in an advance of the analysis approach of the gene structure in recent years, and gene structure of a large number including a human gene has been clarified. The DNA chip (DNA microarray) which carried out alignment immobilization is increasingly used for the analysis of such gene structure on substrates, such as a microscope slide glass, by using the DNA fragment of thousands to 10,000 or more kinds of different classes as a spot.

[0003] The method which supplies the sample solution which contained DNA fragments to the substrate top by the so-called pin, such as a QUILL method, a pin & ring method, or a spring-pin method, as the formation approach of the spot in manufacture of this DNA chip (placing) is use widely, even if it is the case where which approach is adopt, the capacity of each spot and dispersion of a configuration are suppress low, and it becomes important to keep the distance between each spot constant.

[0004] On the other hand, the configuration controllability of a spot is good towards the further densification, and the expectation for development of the new approach excellent in productivity is also great.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] By the way, as shown in drawing 16 , when the spot 202 by dropping of the sample solution is formed on a substrate 200, this spot 202 becomes hemispherical with the surface tension. in this case, few parts 204 which touch a substrate 200 as an amount of the substantial sample fixed on a substrate 200 -- it is -- that amount -- the whole (hemispherical) -- very -- a part -- it is . Since it is not fixed, the remaining part 206 will be flushed at a subsequent washing process, and there is much loss of the sample solution and it has the problem that the utilization ratio of the sample solution is low.

[0006] The cost at the time of manufacturing a DNA chip is substantially governed in the amount of the sample solution, and in the case of an above-mentioned example, almost all the sample solutions will be passed and it becomes disadvantageous in respect of improvement in productive efficiency.

[0007] Moreover, although the sample solution of thousands to 10,000 or more kinds of different classes will be dropped on one substrate, in order to obtain the same diameter of a spot from viscosity differing from surface tension for every sample solution from which a class differs, it is necessary to change the drip of the sample solution according to viscosity, surface tension, etc.

[0008] However, by the conventional technique, since the sample solution adhering to a pin is physically contacted to a substrate the whole pin and he is trying to drop the sample solution, the spot to a substrate top is formed by one dropping, and fine dropping control (control of a drip or a dropping location) cannot be performed, but the problem that dispersion arises is in the path of the spot formed on the substrate.

[0009] Moreover, although the method of mixing organic or inorganic polymer in the sample solution, and holding a DNA fragment physically during polymer bridge formation is also develop in order to make immobilization of a up to [ the substrate of the DNA fragment in the sample solution ] into a more

positive thing, the viscosity of the sample solution increases in this case, it becomes what dries, and thickens and it is easy to solidify, and the pot life of the sample at the time of spot formation becomes short, or there is a problem 1 time of whose drip increases.

[0010] This invention is made in consideration of such a technical problem, and can raise the utilization ratio of the high sample solution of cost, and it aims at offering the manufacture approach of the DNA chip which can aim at improvement in the productivity of a DNA chip, and improvement in the yield.

[0011] Moreover, other objects of this invention are to offer the manufacture approach of the DNA chip which can perform supply control according to the class of sample solution supplied on a substrate, can attain equalization of the diameter of a spot formed on a substrate, and can aim at improvement in dependability in the quality list of a DNA chip.

[0012]

[Means for Solving the Problem] This invention supplies the sample solution on a substrate, and is characterized by carrying out multiple-times supply of said sample solution about the same spot in the manufacture approach of the DNA chip which manufactures the DNA chip by which many spots by the sample solution were arranged on said substrate.

[0013] Thereby, many spots with a geometrically high precision can be arranged on a substrate, and the yield of a DNA chip can be raised. In this case, it is desirable to supply said sample solution by the ink jet method.

[0014] An ink jet method enables only an initial complement at a substrate to supply [ a high speed (-100kHz) ] many drops on a substrate by non-contact at high degree of accuracy. Moreover, it becomes possible to move a pin to the supply origin (sample well) of the sample solution, and for it to become unnecessary to dip the pin point and to form a spot on many substrates into the sample solution, like the conventional pin type, for a short time from the sample solution being continuously supplied through the cavity and inlet which connect a drop with the delivery which carries out the regurgitation, whenever it forms a spot.

[0015] Moreover, as for said sample solution, it is desirable to dilute the sample containing a DNA fragment to predetermined concentration. In this case, as for said sample solution, it is desirable to dilute with the water solution containing the water solution with which the sample containing said DNA fragment contains water or a sodium chloride, or a polymer, and it is desirable that the concentration of extent with which are satisfied of the last request base pair per one spot dilutes by supply of the multiple times to said same spot.

[0016] the advantage that the amount of the expensive DNA fragment in the sample solution which adhere and remain can be reduce relatively be during the supply passage pass in the phase which finished supply the sample solution on the substrate by dilute the concentration of a sample , and it be effective in it be avoidable that the defect of a solution dry , thicken and solidify , get a delivery blocked , and cause the poor regurgitation by the deep sample solution occur . Furthermore, as a big advantage, when the sample solution is supplied on a substrate, the sample solution does not become semi-sphere-like, but serves as a flat configuration. In this case, since most sample solutions supplied to the substrate are fixed on a substrate, also at a subsequent washing process, there is [ of the sample solution ] that no the above will mostly be passed, and the utilization ratio of the sample solution can be raised.

[0017] Moreover, the diameter of a spot of the sample solution formed on a substrate can be made to equalize by changing the degree of dilution according to the class of DNA fragment contained in the sample solution, and changing the viscosity and surface tension of the sample solution.

[0018] Furthermore, as for said sample solution, diluting with the water solution containing a polymer is desirable again. While the increase of the configuration holdout of the spot configuration after being supplied on the substrate, and a configuration are stabilized by this, the configuration change by the drying shrinkage of a spot can be prevented.

[0019] Thus, in this invention, the utilization ratio of the high sample solution of cost can be raised, and improvement in the productivity of a DNA chip and improvement in the yield can be aimed at. Moreover, dropping control according to the class of dropped sample solution can be performed, equalization of the diameter of a spot formed on a substrate can be attained, and improvement in dependability can be aimed at in the quality list of a DNA chip.

[0020] And the process which carries out PCR magnification of said DNA fragment, and prepares an PCR product, the process which dries said PCR product and is used as DNA powder, and the process which melts said DNA powder to the buffer solution are stepped on, and you may make it prepare said

sample in said manufacture approach. On the occasion of dilution, there is no change of quality, the dispersibility to a water solution is good, and is suitable for dilution, and such a sample is made as for the concentration management at the time of dilution to accuracy.

[0021] Moreover, the inlet for pouring said sample solution into at least one or more bases from the exterior in said manufacture approach, in case said sample solution is supplied on said substrate, The cavity with which said sample solution is poured in and filled up, and the delivery which carries out the regurgitation of said sample solution are formed. At least 1 wall surface of said base which forms said cavity is equipped with piezo-electricity / electrostriction component. You may make it use the distributive-pouring equipment with which the sample solution of a class which two or more arrays of the micropipette constituted so that said sample solution might move into said cavity are carried out, and is constituted, and is different from the delivery of each micropipette, respectively is breathed out.

[0022] Whenever piezo-electricity / electrostriction component drives, a minute amount liquid is breathed out from a delivery, and the volume is not [ minuteness and dispersion ] and is fixed. The RF response of an actuation period is attained by using piezo-electricity / electrostriction component, and the time amount which the regurgitation takes is also shortened. Moreover, the sample solution is not dried on the way in order to move in the inside of a closed space, after pouring in the sample solution until it results in the regurgitation. Furthermore, passage to which the sample solution moves the whole base since [ small ] it can form in a compact can be shortened, and thereby, the problem that the sample solution adheres to a passage wall is suppressed to the minimum, and can prevent degradation of the utilization ratio of the sample solution.

[0023] Moreover, the inlet for pouring said sample solution into at least one or more bases from the exterior, in case said sample solution is supplied on said substrate, The cavity with which said sample solution is poured in and filled up, and the delivery which carries out the regurgitation of said sample solution are formed. Two or more arrays are carried out, and the micropipette constituted so that said sample might move into said cavity is constituted, and the sample solution of the same class is breathed out from at least two or more deliveries, and you may make it use the distributive-pouring equipment which forms one spot.

[0024] By breathing out the sample solution of the same class from two or more deliveries, and forming one spot, a spot formation rate speeds up more and a throughput improves.

[0025] The count of supply can be increased without generally, increasing the diameter of a spot, if it makes supply spacing late (for a long time) or processing which dries quickly, thickens the sample solution supplied on the substrate so that it might mention later, and solidifies is performed, although the diameter of a spot increases for every supply when carrying out multiple-times supply of the sample solution.

[0026] Since the sample solution in the part which carried out opening of lengthening supply spacing here to the discharge side of a delivery is breathed out in the state of [ so-called / half-dry ] the condition which dried to some extent and viscosity went up before the regurgitation, even if it repeats supply, although the diameter of a spot does not increase, it makes spot formation time amount increase as a result by this approach, and is not desirable. Moreover, in such a case, managing the so-called half-dry condition quantitatively has many limits, and it tends to generate the nozzle of the poor regurgitation.

[0027] If the sample solution of the same class is breathed out from said two or more deliveries and one spot is formed, while a delivery will move to a regurgitation location, by then, the standby time to regurgitation initiation Two or more deliveries to which desiccation of the sample solution in the part which carried out opening to the discharge side of a delivery went will exist, the same sample solution can be supplied by these deliveries, and spot formation time amount can be shortened as a result.

[0028] Moreover, when a poor regurgitation nozzle occurs, it should prevent making the expensive sample solution useless by performing the regurgitation only in the noise which the defect has not generated. Furthermore, the structure where the number of the inlets which are open for free passage to the cavity which at least two or more deliveries where the sample solution of the same class is breathed out connect is one can reduce the count of impregnation of the sample solution, and is desirable.

[0029] Moreover, in the case of a non-contact ink jet method, the timing which carries out the regurgitation of the sample solution of the same class from two or more deliveries may be simultaneous. In this case, you may make it double the point of fall of the sample solution breathed out. A spot formation rate can be raised by doing so.

[0030] However, in order to make more into high degree of accuracy location precision of the sample solution supplied on a substrate, the approach of supplying, when regurgitation timing is shifted and

each delivery is located right above a spot formation location is good.

[0031] Furthermore, it is desirable that two or more arrays are carried out and the micropipette constituted again so that the sample solution might move by the laminar flow in the inside of said cavity is constituted. Generating of air bubbles etc. can be prevented and evasion of the poor regurgitation and the endurance of a micropipette increase because migration of the sample solution is a laminar flow.

[0032] When using said distributive-pouring equipment, after pouring in the sample solution from which a class differs, respectively from said inlet corresponding to said delivery which carries out the regurgitation of the sample solution from which a class differs, respectively into said two or more cavities, it is desirable by making said piezo-electricity / electrostriction component drive to make the sample solution from which the class in said two or more cavities differs breathe out from said delivery. By such configuration, the sample solution of the class from which plurality differed can be supplied on a substrate, without causing cross contamination at the same stage.

[0033] Moreover, you may make it make the sample solution from which the class in said two or more cavities differs breathe out from said delivery by being beforehand filled up with a displacing solution in two or more cavities, when using said distributive-pouring equipment, and making said piezo-electricity / electrostriction component drive, after pouring in making the sample from which a class differs permute within said two or more cavities from said inlet subsequently. After a cheap displacing solution permutes the inside of a cavity certainly beforehand, by permuting an expensive sample, generating of the poor regurgitation can be prevented thoroughly and the regurgitation of the expensive sample can be carried out efficiently.

[0034] Although the permutation from the displacing solution in a cavity to the sample solution is a delivery to vacuum attraction etc. and may perform a displacing solution by carrying out attraction blowdown, it is desirable to pour in making the sample from which a class differs while making said piezo-electricity / electrostriction component drive permute within said two or more cavities from said inlet. The amount of the displacing solution to discharge can be controlled with a sufficient precision by doing so, and the expensive sample solution is not discharged vainly.

[0035] Although the terminal point of the completion of a permutation asks for the rate and volume which a sample moves beforehand and may control them by permutation time amount, a discharge, etc., it can detect a terminal point with a precision more sufficient [ grasping by detecting change of the fluid characteristic in the cavity concerned ], and is still more desirable.

[0036] In this invention, since change of the fluid characteristic in a cavity is detected and he is trying to grasp the completion of a permutation, even if the sample solution and a displacing solution are somewhat mixed in passage, distinction of the part currently mixed and an unmixed part can distinguish with ease and a sufficient precision. Consequently, the amount of the sample solution which must mix with a displacing solution and must be purged can be lessened, and the utilization ratio of the sample solution can be gathered.

[0037] Moreover, change of the fluid characteristic in a cavity impresses the electrical potential difference which excites an oscillation to piezo-electricity / electrostriction component, and you may make it grasp it by detecting change of the electric constant accompanying the oscillation. It is not necessary to install a special sensing element etc. by this, and cheap and highly precise detection can be performed.

[0038] In addition, as for said displacing solution, it is desirable that degassing processing is carried out beforehand. By carrying out like this, it can do smoothly, without generating air bubbles etc. and catching restoration into the cavity of a displacing solution in the middle, and thereby, the permutation to the sample solution is ensured and the regurgitation is stabilized. Furthermore, after pouring in the medium liquid which does not contain the DNA fragment which makes said sample solution and specific gravity almost the more nearly same than an inlet after being poured in and filled up with the displacing solution in the cavity, and making it permute within said cavity, the sample solution from which a class differs is poured in into a cavity from said inlet, and it may be filled up with the sample solution. Between a displacing solution and the sample solution, it is cheap, and by minding the medium liquid which does not contain the DNA fragment which makes said sample solution and specific gravity almost the same, the expensive sample solution is mixed in the displacing solution with which specific gravity differs, and the nonconformity that many amounts of purges must be taken as a result can be avoided.

[0039] And since he is trying to use two or more micropipettes in this invention, many kinds of samples can be supplied simultaneously at once, and the produced pipet with a faulty part can be exchanged



easily, and a maintenance is also easy. Furthermore, like a DNA chip, since alignment arrangement of the delivery is carried out in all directions, when carrying out alignment immobilization of the spot two-dimensional on a substrate, it becomes the optimal.

[0040] Moreover, in this invention, in case said sample solution is supplied on said substrate, it is desirable desiccation or to perform said sample solution, making it thicken or solidify at least. Immobilization of the sample solution supplied on the substrate is rash by this, and who (phenomenon which the diameter of a spot extends) accompanying dilution of the sample solution can be prevented effectively.

[0041] Although heating heating a substrate, the regurgitation, or the supplied sample solution as desiccation, thickening, or solidification etc. is mentioned, as the heating approach, it is desirable to use a laser beam, infrared radiation, an electromagnetic wave, etc.

[0042] Especially these approaches can heat a minute field selectively. Like this invention, while the spot by the breathed-out sample solution needs to be heated promptly, it must avoid that the poor regurgitation arises in desiccation by heating etc. in the delivery immediately near the spot. In such a case, above-mentioned desiccation, thickening, or solidification is suitable. Since it can be certainly intercepted with metal shielding, especially the electromagnetic wave is suitable when preventing heating of an unnecessary delivery. Moreover, when using a laser beam and infrared radiation, these laser beams and infrared radiation are irradiated at a substrate, and the sample solution may be heated indirectly.

[0043] Moreover, you may make it cool a substrate, the regurgitation, or the supplied sample solution as desiccation, thickening, or solidification of the dropped sample solution in this invention. Cooling is suitably adopted, when DNA in the sample solution receives breakage with heating, or when the component in the sample solution softens with heating.

[0044] Moreover, in case said sample solution is supplied on said substrate, in this invention, the amount of supply is changed and it may be made for it to be made to carry out, shifting a supply location, and to perform it. That is, the sample solution is supplied to a location respectively different about 2 to 100 times, corresponding to the class of sample solution, and one diameter of a spot is formed. In this case, since the number of supplies can be changed according to the class of sample solution and a supply location can be determined further, irrespective of the class of sample solution, all the diameters of a spot can be formed in homogeneity, and improvement in dependability can be aimed at in the improvement list of the quality of a DNA chip.

[0045] In addition, the thing for which one spot is formed, shifting a supply location When it is impossible and the amount of supply per drop is made to about  $1/100$  to  $1/10$  by the ink jet method as compared with a pin type in the conventional pin type spot By being the technique of becoming possible for the first time, and combining with said desiccation, thickening, and solidification Spot configurations other than the conventional circular spot are made possible, and it has the advantage that the range which can take matching with the reader machines (CCD image pick-up equipment etc.) of a DNA chip can be extended.

[0046] Furthermore, it has the advantage that the configuration of the height direction of a spot of forming one spot, shifting a supply location in a minute drop is also controllable by adjusting the location to accumulate, and the fluorescence intensity pattern which emits light from a spot can be freely designed within a spot.

[0047] Moreover, change of the electrical-potential-difference pattern which is impressed [ in addition to change of the number of supplies ] to regurgitation conditions, i.e., piezo-electricity / electrostriction component, in the case of an ink jet method is also possible for change of the amount of supply.

[0048] Moreover, in this invention, the thing which supply said sample solution on said substrate and for which it precedes supplying in the case and an oscillation is given to said sample solution is desirable.

[0049] In this case, it is avoided that the DNA fragment contained in the sample solution precipitates, and it can make homogeneity distribute a DNA fragment in the sample solution. Thereby, about the sample solution of the same kind formed in each substrate, most dispersion of the content of a DNA fragment can be abolished and dispersion in the gene analysis for every substrate can be abolished.

[0050] Furthermore, in this invention, supply the sample solution by the ink jet method on a substrate, and it sets again to the manufacture approach of the DNA chip which manufactures the DNA chip by which many spots by the sample solution were arranged on said substrate. the time of supplying said sample solution on said substrate -- the surrounding humidity of the regurgitation [ said sample solution ] and the part to supply -- other parts -- alternative -- high -- carrying out -- said sample solution

-- desiccation -- or you may make it not thicken or solidify The poor regurgitation can be avoided when this uses the sample solution which dries, thickens and is especially easy to solidify.

[0051] Moreover, in this invention, after producing the substrate with which said sample solution was supplied on said substrate, and many spots were arranged and cooling said substrate at 0 degree C or less, the process returned to the bottom of the room temperature in which the gas of sufficient volume of 30% or more of humidity exists may be adopted.

[0052] Furthermore, after producing the substrate with which said sample solution was supplied on said substrate, and many spots were arranged, said substrate may be exposed to the bottom of the ambient atmosphere in which the gas of sufficient volume of 80% or more of humidity exists, or you may expose into a steam including Myst.

[0053] These invention is suitably adopted, when presenting the shape of so-called anchor ring in which the polymer etc. was mixed, the dropping approach of the sample solution was adjusted using the sample solution to which viscosity was made to increase, the periphery part of a spot rose and the amount of center section dented the configuration of the spot on a substrate.

[0054] It becomes that in the case of the shape of such an anchor ring the boundary of the periphery part of a spot and a substrate is conspicuous, and it is easy to be observed, and like the sample solution containing a DNA fragment, when forming the spot of a transparent and colorless liquid on a transparent and colorless glass substrate etc., it becomes easy to observe the spot configuration, and has the advantage of becoming easy to inspect the quality of a spot configuration.

[0055] However, it sets at the spot which presented the shape of such an anchor ring. Even if most climax parts of a periphery are flushed at the washing process at the time of subsequent immobilization in many cases Since there were many substantial samples fixed (deeply), when they are used as a DNA chip in a periphery part, distribution of the quantity of light from fluorescence emitted from a spot will present the shape of an anchor ring within a spot, and will become degradation of sensibility, and the cause of dispersion.

[0056] therefore, in order to reconcile the goodness (the shape of a non-anchor ring) of (the shape of an anchor ring), and a spot configuration in the ease of carrying out of inspection In case the sample solution is supplied to a substrate, the sample solution is made dropped at discharge and a substrate by an ink jet method etc. By hydrophobic control with the kinetic energy and substrate, as the sample solution is centralized on the periphery part of the spot, the shape of an anchor ring is formed. Then, while making the viscosity of the sample solution increase to extent which does not become spherical with the surface tension of a liquid beforehand, after inspection termination, the method of changing the shape of an anchor ring in the shape of a non-anchor ring is suitable for it with the increase of the fluidity of the sample solution which forms a spot, and surface tension. This invention is suitable in order to realize this approach.

[0057] Namely, after cooling the substrate with which the anchor ring-like spot was formed at 0 degree C or less, By returning to the bottom of the room temperature in which the gas of sufficient volume of 30% or more of humidity exists, or exposing said substrate to the bottom of the ambient atmosphere in which the gas of sufficient volume of 80% or more of humidity exists, or exposing into a steam including Myst Myst contacts, the fluidity of the sample solution will change in the shape of [ increase and whose a spot configuration are non-anchor rings-like ] a semi-sphere, will have [ moisture will be incorporated in the sample solution from a surrounding gas, or ], and improvement in sensibility of a DNA chip and reduction of sensibility dispersion will be achieved. Of course, after a spot configuration becomes semi-sphere-like, it may throw a substrate into a desiccation process promptly, and may fix a configuration. In addition, when exposing to a steam, of course, temperature of a steam must be made below into the temperature which is extent in which a DNA fragment does not deteriorate.

[0058]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the example of a gestalt of some operations of the manufacture approach of the DNA chip concerning this invention is explained, referring to drawing 1 - drawing 15 .

[0059] The manufacture approach of the DNA chip concerning the gestalt of this operation The head end process S1 which forms the poly-L-lysine layer 12 (refer to drawing 10 A) in the front face of a substrate 10 as shown in drawing 1 , As the diluted sample solution is supplied on a substrate 10 (dropping is included) and it is indicated in drawing 3 as the sample preparation process S2 which prepares the sample containing a DNA fragment, and the dilution process S3 which dilutes the concentration of the obtained sample Supply process S4 which creates the spot finishing substrate with which many spots 80

were arranged on the substrate 10, It consists of a desiccation process S5 which heat is applied [ process ] to a substrate 10 and dries a spot 80, and a fixed process S6 which fixes the DNA fragment in a spot 80 on a substrate 10, and DNA chip 20 shown in drawing 3 is manufactured.

[0060] Moreover, the sample preparation process S2 includes the magnification process S11 which carries out PCR magnification of the DNA fragment, and prepares an PCR product, the powder generation process S12 which dries the acquired PCR product and is used as DNA powder, and the mixed process S13 which melts the obtained DNA powder to the buffer solution, as shown in drawing 2.

[0061] If it explains concretely, first, a head end process S1 will dip a substrate 10 in an alkali solution, and will shake it slowly at a room temperature for at least 2 hours. Said alkali solution is a solution stirred until it melted NaOH to distilled water, it added ethanol further and it became transparence thoroughly.

[0062] Then, a substrate 10 is taken out, it moves into distilled water, a rinse is carried out, and an alkali solution is removed. Subsequently, a substrate 10 is dipped in the poly-L-lysine liquid which added poly-L-lysine into distilled water, and was prepared, and it is left for 1 hour.

[0063] Then, a substrate 10 is taken out, centrifugal is applied and carried out to a centrifuge, and excessive poly-L-lysine liquid is removed. Subsequently, 40 degrees C of substrates 10 are dried about 5 minutes, and the substrate 10 with which the poly-L-lysine layer 12 was formed in the front face is obtained.

[0064] Next, the sample preparation process S2 adds 3Msodium acetate and isopropanol to the PCR product (magnification process S11) amplified with the known PCR machine first, and leaves them for several hours. Then, centrifugal [ of this PCR product solution ] is carried out with a centrifuge, and a DNA fragment is settled.

[0065] The rinse of the settled DNA fragment is carried out by ethanol, after centrifugal, it is made to dry and DNA powder is generated (powder generation process S12). The buffer solution (for example, TE buffer solution) is added to the obtained DNA powder, and (the mixed process S13) and a sample are prepared by leaving it for several hours and melting thoroughly. The concentration of the sample in this phase is 1-10micro g/mu liter.

[0066] And the concentration of the obtained sample is diluted with the gestalt of this operation (dilution process S3). He is trying to dilute with this dilution process S3 in the water solution which contains water and a sodium chloride for said sample, the water solution containing a polymer, etc. In addition, the sample solution after dilution may be left for 1 hour to several hours if needed, or may mix frozen - thawing, and may familiarize a sample and a diluent. Then, said diluted sample solution is supplied on a substrate 10, centrifugal separation or after carrying out vacuum degassing processing and removing the bubble in a solution, and a spot finishing substrate is created (supply process S4).

[0067] Especially, with the gestalt of this operation, distributive-pouring equipment 30 as shown in drawing 4 A - drawing 4 C and drawing 5 is used for supply process S4.

[0068] This distributive-pouring equipment 30 arranges ten micropipettes 34 in five-line two trains on the top face of the rectangle-like stationary plate 32, and has the configuration in which micropipette 34 group which aligned in each train direction was made to fix to a stationary plate 32 through a fixture 36, respectively.

[0069] As shown in drawing 4 C and drawing 5, a micropipette 34 vibrates the sample inlet 52 formed in the top face of the base 50 which has the configuration of a rectangular parallelepiped mostly, the sample delivery 54 formed in the underside of this base 50, the cavity 56 formed between the sample inlet 52 and the sample delivery 54 inside, and a base 50, or has the actuator section 58 to which the volume of a cavity 56 is changed, and is constituted.

[0070] Therefore, as shown in drawing 5, the breakthrough 40 is formed in the part corresponding to the sample delivery 54 of a micropipette 34 at said stationary plate 32, respectively. By this, the sample solution breathed out from the sample delivery 54 of a micropipette 34 will be supplied to the substrate 10 fixed under the stationary plate 32 through said breakthrough 40.

[0071] The introductory hole 60 of the shape of about L characters with large aperture width is formed applying this micropipette 34 to the interior of a base 50 from the sample inlet 52. Between this introductory hole 60 and cavity 56, the 1st free passage hole 62 with a small path is formed, and the sample solution poured in from the sample inlet 52 is introduced into a cavity 56 through the introductory hole 60 and the 1st free passage hole 62.

[0072] Among cavities 56, it is open for free passage to the sample delivery 54, and the 2nd free passage

hole 64 with a larger path than the 1st free passage hole 62 is formed in a location which is different in said 1st free passage hole 62. He forms the 1st free passage hole 62 in sample inlet 52 approach among the undersides of a cavity 56, and is trying to form the 2nd free passage hole 64 in the location corresponding to the sample delivery 54 among the undersides of a cavity 56 similarly with the gestalt of this operation.

[0073] Furthermore, with the gestalt of this operation, the part which the top face of a cavity 56 touches among bases 50 is used as thin meat, and has the structure of being easy to receive an oscillation to external force, and it functions as the oscillating section 66. Said actuator section 58 is formed in the top face of the oscillating section 66.

[0074] A base 50 carries out the laminating of the green sheet (1st sheet metal layer 50A, 1st spacer layer 50B, 2nd sheet metal layer 50C, 2nd spacer layer 50D, and 3rd sheet metal layer 50E) of the zirconia ceramics of two or more sheets, is really calcinated and is constituted.

[0075] That is, 1st sheet metal layer 50A of the thin meat with which the window part from which a base 50 constitutes the sample inlet 52 is formed, and constitutes the oscillating section 66 in a part, 1st heavy-gage spacer layer 50B in which two or more window parts which constitute the part and cavity 56 of the introductory hole 60 were formed, respectively, 2nd sheet metal layer 50C of the thin meat with which two or more window parts which constitute a part of a part of introductory hole 60, 1st free passage hole 62, and 2nd free passage hole 64 were formed, respectively, The laminating of 2nd heavy-gage spacer layer 50D in which two or more window parts which constitute a part of introductory hole 60 and a part of 2nd free passage hole 64 were formed, respectively, and the 3rd sheet metal layer 50E of the thin meat with which the window part from which the sample delivery 54 is constituted was formed is carried out, and it really calcinates and is constituted.

[0076] The actuator section 58 has the lower electrode 70 directly formed on this oscillating section 66 besides said oscillating section 66, the piezo-electric layer 72 which consists of the piezo-electricity / an electrostriction component formed on this lower electrode 70, anti-ferroelectric substanc, etc., and the up electrode 74 formed in the top face of this piezo-electric layer 72, and is constituted.

[0077] The lower electrode 70 and the up electrode 74 are electrically connected to the actuation circuit which is not illustrated through two or more pads 76 and 78 formed in the top face of a base 50, respectively, as shown in drawing 4 C.

[0078] According to the micropipette 34 of the above configurations, when electric field arise between the up electrode 74 and the lower electrode 70, the piezo-electric layer 72 will deform, the oscillating section 66 will deform in connection with it, and the volume of the cavity (pressurized room) 56 which is in contact with the oscillating section 66 will decrease or increase.

[0079] It is breathed out at a predetermined rate from the sample delivery 54 which the sample solution with which reduction of the volume of this cavity 56 was filled up in the cavity 56 opens for free passage to a cavity 56, and as shown in drawing 3, the sample solution breathed out from the micropipette 34 can produce DNA chip 20 by which alignment immobilization was carried out as a spot 80 on the substrates 50, such as microscope slide glass. Moreover, the increment in the volume of this cavity 56 is poured in and filled up with the new sample solution from the 1st free passage hole 62 in a cavity 56, and it prepares for the regurgitation of a degree.

[0080] In addition, as structure where the volume of a cavity 56 decreases, the so-called equipment structure of an ink jet method is employable with actuation of the actuator section 58 (refer to JP,6-40030,A).

[0081] And the cavity (pressurized room) 56 is formed in a passage dimension which the sample solution containing a DNA fragment etc. moves under a condition with little turbulence.

[0082] That is, although the dimension of a cavity 56 changes with the class of sample, the magnitude of the drop to create, and formation consistencies For example, an about one to 10000-base pair DNA fragment is dissolved in x1TE buffer solution (buffer solution) by the concentration below 100micro g/mu liter. Furthermore, the sample mixed with the water solution containing an equivalent polymer is set when the diameter of 30-500 micrometerphi drop is dropped in 50-600-micrometer pitch. 1-5mm and the cavity width of face (W) of 0.1-0.5mm are [ cavity length (L) / 0.1-1mm and the cavity depth (D) ] desirable, as shown in drawing 6. Moreover, a smooth thing is good so that there may be no projection which disturbs flow in the wall of a cavity 56, and as for the construction material, it is desirable to consist of ceramics with the sufficient sample solution and compatibility.

[0083] By making it such a configuration, it can lead to the sample delivery 54, without disturbing the flow of the sample solution which moves a cavity 56 into a cavity 56 through the introductory hole 60

from the sample inlet 52, and the 1st free passage hole 62 as a part of passage from the sample inlet 52 to the sample delivery 54.

[0084] In addition, bases 50 may be the zirconia ceramic sintered compact which it was the one laminating of zirconia ceramics, and a baking object as mentioned above, and also formed the actuator section 58, and an adapter with a metal, a resin film, etc. As for especially 3rd sheet metal layer 50E in which the sample delivery 54 was formed, it is desirable that it is the sheet which pierced metals, such as a sheet into which organic resin, such as a PET film, was processed by excimer laser etc., or a stainless steel film, with metal mold etc. in consideration of matching with the processing method.

[0085] Moreover, although optimal design is made with the physical properties of the sample solution which carries out the regurgitation, discharge quantity, a regurgitation rate, etc., as for the dimension of the sample delivery 54 and the 1st communicating pore 62, it is good that it is 10-100 micrometerphi extent.

[0086] The 1st two communicating pore 62 opens drawing 7 for free passage to the introductory hole 60 connected with one sample inlet 52 and it, and two passage 65 in which a cavity 56, the 2nd communicating pore 64, and the sample delivery 54 were formed continuously is independently formed in each communicating pore 62, respectively. The actuator section 58 (not shown) wired and driven independently, respectively is formed in the top face of each cavity 56. According to the micropipette 34 of such a configuration, simultaneous in the same sample solution, timing can be shifted and it can supply on a substrate 10.

[0087] By the way, as shown in drawing 4 A, two or more pins 38 for carrying out positioning immobilization of the micropipette 34 are formed in the top face of a stationary plate 32. When it fixes a micropipette 34 on a stationary plate 32, making the pin 38 of a stationary plate 32 insert in the hole 90 (to refer to drawing 4 C) for positioning prepared in the both sides of the base 50 of a micropipette 34, it is laying a micropipette 34 in a stationary plate 32, and array positioning of two or more micropipettes 34 will be automatically carried out along predetermined.

[0088] Moreover, each fixture 36 has the presser-foot plate 100 which suppresses two or more micropipettes 34 to a stationary plate 32. Two or more micropipettes 34 with said presser-foot plate 100 can be suppressed now to a stationary plate 32 at once by forming in the ends of the presser-foot plate 100 the insertion hole in which a screw 102 is inserted, respectively, inserting a screw 102 in this insertion hole, and thrusting into a stationary plate 32. And one unit consists of two or more micropipettes 34 suppressed with one presser-foot plate 100. The example of drawing 4 A shows the example by which one unit was constituted from five micropipettes 34 arranged in the direction of a train.

[0089] Moreover, the introductory hole 104 (refer to drawing 4 B) for supplying the sample solution to the part corresponding to the sample inlet 52 of each micropipette 34, respectively, when two or more micropipettes 34 are suppressed is formed in the presser-foot plate 100, and the tube 106 for leading the sample solution to the introductory hole 104, respectively is held at the upper bed section of each introductory hole 104.

[0090] In addition, when the increase in efficiency of a wiring activity was taken into consideration and the width of face of the presser-foot plate 100 suppresses two or more micropipettes 34 to a stationary plate 32, it is desirable that it is the dimension which the pads 76 and 78 connected with each electrodes 70 and 74 of the actuator section 58 face up.

[0091] Thus, in the sample delivery 54, the plurality of the micropipette 34 which has the sample inlet 52 and the sample delivery 54 is made to set up in the condition of having turned downward, and above-mentioned distributive-pouring equipment 30 is constituted [ plurality ], respectively.

[0092] That is, each micropipette 34 makes each sample inlet 52 an upside, and the sample delivery 54 is made into the bottom, and array arrangement of each sample delivery 54 is carried out in all directions, and the sample solution from which a class differs from the sample delivery 54, respectively is breathed out.

[0093] In the distributive-pouring equipment 30 which has such a configuration, as an approach of supplying the sample solution from which a class differs corresponding to each sample inlet 52, respectively, as shown in drawing 8, there is the approach of using the cartridge 112 by which the crevice (reservoir section) 110 of the shape of much cross section of about V characters was arranged. This approach can consider how to supply the sample solution which suited each crevice 110 to each micropipette 34 through a tube 106 etc. by paying the sample solution from which a class differs, respectively to each crevice 110 of a cartridge 112, and opening the bottom of each crevice 110 with



installation, a needle, etc. so that each crevice 110 and a tube 106 may correspond this cartridge 112, respectively.

[0094] Moreover, by opening the bottom of each crevice 110 with installation, a needle, etc. so that each crevice 110 and each introductory hole 104 of a fixture 36 may correspond a cartridge 112, respectively when not using a tube 106 Others [ approach / of supplying the sample solution which suited each crevice 110 to each micropipette 34 through the introductory hole 104 ], Beforehand, a needle etc. is formed near each introductory hole 104 in a fixture 36, and each crevice 110 may be made to be opened at the same time it attaches a cartridge 112 in a fixture 36.

[0095] In addition, a gas etc. may be fed after opening and the device which extrudes the sample solution compulsorily may be added. Moreover, having the device which washes the space from the sample inlet 52 formed in the base 50 of each micropipette 34 to the sample delivery 54 does not have contamination of the DNA fragment of the varieties of thousands to tens of thousands of kinds etc., and in order that purity may moreover improve the regurgitation as a spot 80, it is desirable.

[0096] Although binding tight to a stationary plate 32 with a screw 102 is performing the ends of the presser-foot plate 100 in the example of drawing 4 A, a screw, a spring, etc. perform the fixing method of the presser-foot plate 100 mechanically, and also adhesives etc. may perform it.

[0097] Moreover, as mentioned above, the base 50 which constitutes a micropipette 34 is formed with the ceramics, for example, fully stabilized zirconia, partially stabilized zirconia, an alumina, a magnesia, silicon nitride, etc. can be used for it.

[0098] Among these, stabilization/partially stabilized zirconia is most suitably adopted also in sheet metal from that a mechanical strength is large, that toughness is high, and reactivity with the piezo-electric layer 72 or electrode material being small.

[0099] And when using stabilization/partially stabilized zirconia as an ingredient of base 50 grade, into the part (oscillating section 66) at least in which the actuator section 58 is formed, it is desirable that additives, such as an alumina or a titania, contain.

[0100] Moreover, the piezo-electric layer 72 which constitutes the actuator section 58 As electrostrictive ceramics, for example, lead zirconate, lead titanate, magnesium lead niobate, Magnesium tantalate, lead, nickel lead niobate, lead zinc niobate, Although the compound ceramics containing the component which combined manganese lead niobate, antimony lead stannate, manganese tungstic-acid lead, cobalt lead niobate, barium titanate, etc. and these either can be used In the gestalt of this operation, the ingredient which uses as a principal component the component which consists of lead zirconate, lead titanate, and magnesium lead niobate is used suitably.

[0101] It adds to such an ingredient having a high electromechanical coupling coefficient and a high piezoelectric constant, and this has small reactivity with the base ingredient at the time of sintering of the piezo-electric layer 72, and is because it is based on the ability of the thing of a predetermined presentation to be formed in stability.

[0102] Furthermore, with the gestalt of this operation, the ceramics which added suitably oxides, such as a lanthanum, calcium, strontium, molybdenum, a tungsten, barium, niobium, zinc, nickel, manganese, a cerium, cadmium, chromium, cobalt, antimony, iron, an yttrium, a tantalum, a lithium, a bismuth, and tin, the combination of one of these, or other compounds may be used for said electrostrictive ceramics.

[0103] For example, it is also desirable to use the ceramics which uses lead zirconate, lead titanate, and magnesium lead niobate as a principal component, and contains a lanthanum and strontium in this.

[0104] On the other hand, the up electrode 74 and the lower electrode 70 in the actuator section 58 It is desirable to be a solid-state and to consist of room temperatures with the conductive metal. For example, aluminum, titanium, chromium, iron, cobalt, nickel, Copper, zinc, niobium, molybdenum, a ruthenium, palladium, a rhodium, The alloy which combined silver, tin, a tantalum, a tungsten, iridium, platinum, gold, or metal simple substances or these either is used, and the cermet ingredient which made these distribute the same ingredient as the piezo-electric layer 72 or a base 50 further may be used.

[0105] Next, after leaving the spot finishing substrate which supplied the sample solution on the substrate 10 in the 80-degree C thermostat with the gestalt of this operation for about 1 hour using the above distributive-pouring equipments 30 and drying a spot 80 (desiccation process S5), An ethanol permutation (dehydration) is performed, a DNA fragment is fixed on a substrate 10 (fixed process S6), and DNA chip 20 is manufactured for the UV irradiation of 120mJ(s), 20-minute immersion (blocking processing) into NaBr-liquid, and boiling 2 minutes.

[0106] Next, the sample solution is supplied on a substrate 10 using this distributive-pouring equipment 30, and it explains, referring to drawing 9 - drawing 15 about some approaches of forming a spot 80.



[0107] First, the 1st approach is filled up with the sample solution (fully diluted) from which a class differs in the cavity 56 of each micropipette 34 through the introductory hole 104 of a fixture 36, respectively from each tube 106, subsequently, drives each actuator section 58 and makes the sample solution breathe out from the sample delivery 54 of each micropipette 34, as shown in drawing 9.

[0108] Here, when the actuator section 58 carries out ON actuation and decreases the volume of a cavity 56 among the voltage waveforms impressed to each electrodes 70 and 74 of the actuator section 58, a pulse-electrical potential difference will be impressed to each electrodes 70 and 74. In this case, the deformation of the oscillating section 66, deformation velocity, etc. change, and, thereby, the discharge quantity of the sample solution can be controlled by changing the amplitude (electrical potential difference) of a pulse, the variation per unit time amount (standup include angle of a voltage waveform), pulse width, etc. Moreover, the count of dropping of the sample solution per unit time amount can be changed by changing the pulse number generated at a fixed period.

[0109] Although a supply location is fixed and the count of supply is usually piled up when carrying out multiple-times supply of the sample solution and forming one spot 80, a supply location may be shifted for every supply. For example, as shown in drawing 10 A and drawing 10 B, by changing the supply location of the sample solution suitably, minute spot 80a by two or more sample solutions will be formed in one spot 80 (a two-dot chain line shows) which should be formed, and as shown in (coalesce) and drawing 11 A and drawing 11 B by these minute spot 80a being together put on a substrate 10, one spot 80 will be formed. In this case, according to the class of sample solution to supply, equalization of the path of each spot 80 formed on a substrate 10 can be attained by controlling the count of supply, a supply location, and 1 time of the amount of supply.

[0110] Furthermore, in case the sample solution is supplied on a substrate 10, the part of this sample solution is dried, and he thickens, and is trying to solidify with the gestalt of this operation, as shown in drawing 12 A - drawing 13. This processing is realizable by heating a substrate 10.

[0111] As an approach of heating a substrate 10, as shown in drawing 13, there is a method of irradiating the rear face of a substrate 10 and heating the infrared radiation by which outgoing radiation was carried out from an infrared lamp 122. Moreover, as the sample solution is shown in drawing 12 A and drawing 12 B as an approach of heating directly, there is the approach of doubling a focus at the sample solution, irradiating laser beam L by which outgoing radiation was carried out from the laser light source 120 and the electromagnetic wave source of release 121, and an electromagnetic wave E, and heating. Although the sample solution may be heated in the condition of having been supplied on the substrate 10, irradiating and heating is desirable, while being breathed out from the sample delivery 54 and falling on a substrate 10 from the stability of the configuration in the case of supply, and a viewpoint of breadth prevention of a spot 80.

[0112] Moreover, since an electromagnetic wave E can heat the thing containing moisture selectively like the sample solution, it can heat only the sample solution (sample solution under supply) which forms a spot 80, and is more desirable. In addition, the sample delivery 54 which finished the regurgitation on the occasion of heating may be covered with a metal shielding plate etc. in order to avoid the poor regurgitation by desiccation.

[0113] Furthermore, in case the sample solution is supplied on a substrate 10, he is trying to cool the sample solution and a substrate 10 with the gestalt of this operation again. The cooling approach may cool beforehand the substrate 10 with which the sample solution is supplied below to a room temperature, and may be wiping the cooling agent which becomes the sample solution itself from a chlorofluorocarbon-replacing material, liquid nitrogen, etc. However, since such cooling processing has a possibility of adhesion of the waterdrop by \*\*\*\* of the moisture from a surrounding gas taking place, and passing spot 80 the very thing on the occasion of cooling, it needs rate management of humidity management of a surrounding gas, cooling, and an ordinary temperature return etc.

[0114] Moreover, after filling up a cavity 56 with the sample solution, it is desirable to impress the electrical potential difference of extent which excites an oscillation to the actuator section 58. The DNA fragment contained in the sample solution with which it filled up in the cavity by this is distributed by homogeneity, and it stops producing dispersion in the amount of the DNA fragment for every dropping.

[0115] Next, the 2nd approach using distributive-pouring equipment 30 is explained. As shown in drawing 14, this 2nd approach is filled up with displacing solutions, such as purified water and the buffer solution, in the cavity 56 of each micropipette 34 through the introductory hole 104 of a fixture 36, respectively from each tube 106, and subsequently it pours them in, making the sample diluted beforehand permute in a cavity 56 from the sample inlet 52. And the actuator section 58 is made to drive

and regurgitation supply of the sample solution is carried out on a substrate 10. In addition, the medium liquid (for example, mixed liquor of the buffer solution and the water solution containing a polymer) which does not contain the DNA fragment which makes the sample solution and specific gravity almost the same may be minded between a displacing solution and the sample solution.

[0116] As for completion of the laminar-flow permutation of the sample in a cavity 56, it is desirable to grasp by detecting change of the fluid characteristic in a cavity 56.

[0117] In addition, although it is desirable that the displacing solution in a cavity 56 and the permutation of a sample are performed by the laminar flow, when the class of sample changed, or when the passing speed of a liquid is very quick, the neighborhood part of the 1st free passage hole 62 may not necessarily be a laminar flow among cavities 56. In this case, although the amount of purges of the sample solution increases by mixing of the sample solution and a displacing solution, by detecting change of the fluid characteristic in a cavity 56, it is judging the completion of a permutation and buildup of the amount of purges is made to min.

[0118] Here, change of the fluid characteristic in a cavity 56 impresses the electrical potential difference of extent which excites an oscillation to the actuator section 58, and grasps it by detecting change of the electric constant accompanying the oscillation. Detection of such change of a fluid characteristic is indicated by JP,8-201265,A, and refer to this content for it.

[0119] To the actuator section 58, it is predetermined spacing, and the electrical installation from the power source for regurgitation actuation is separated with a relay, a means to measure resonance frequency is simultaneously connected with a relay, and, specifically, the impedance or resonance frequency in the event is measured electrically.

[0120] Thereby, it can grasp whether the viscosity of a liquid, specific gravity, etc. are the target samples (liquid containing a DNA fragment etc.). That is, in each micropipette 34, since micropipette 34 the very thing functions as a sensor, the configuration of a micropipette 34 can also be simplified.

[0121] And after said permutation ends, the actuator section 58 is driven on the actuation conditions corresponding to the liquid optimum dose according to the diameter of a spot for which it can ask, and DNA chip 20 is manufactured by repeating supply of a up to [ the substrate 10 of the sample solution ]. Usually, although one spot 80 is formed, it carries out by breathing out micropipettes 34-1 - 100 drops of numbers.

[0122] In addition, if the amount of the sample in the sample inlet 52 decreases, it can use up by adding the water solution containing the buffer solution, purified water, or a sodium chloride, making it air bubbles not enter all over passage, and continuing the regurgitation, without leaving the sample solution in a micropipette 34. Similarly completion (termination of the sample regurgitation) of the permutation from a sample to a displacing solution is performed by detection of the viscosity of the liquid using the actuator section 58, and specific gravity.

[0123] Moreover, it is desirable to use what removed the dissolved gas in a solution through deaeration actuation as the displacing solution to be used, medium liquid, and the sample solution beforehand. Even when being filled up with the sample solution in the passage of a micropipette 34 by using such a solution, and air bubbles are caught in the middle of passage and the defect of restoration arises, while melting the air bubbles into the sample solution and being able to avoid nonconformity, air bubbles are not generated in a fluid in the middle of the regurgitation, and nonconformity of the regurgitation is not produced.

[0124] Moreover, in the 2nd above-mentioned approach, breathing out the sample solution, a displacing solution like the water solution containing the buffer solution, purified water, or a sodium chloride is injected into a cavity from the sample inlet 52, and discharge and the next sample impregnation can be similarly equipped with the sample solution which remains in a cavity 56 by the laminar-flow permutation thoroughly.

[0125] And it can grasp by detecting change of the fluid characteristic in a cavity 56 also as well as detecting whether the sample solution remains in a cavity 56 (can the regurgitation be carried out as the sample solution or not?). In this case, while being able to lessen extremely the amount of purges of the sample with which an activity is not presented according to a laminar-flow permutation or the completion detection device of a permutation, the utilization ratio of the sample solution can be improved.

[0126] Moreover, in case a cavity 56 is filled up with a sample from the sample inlet 52, the laminar-flow permutation of the sample may be carried out into a cavity 56 from the sample inlet 52, making the actuator section 58 drive. In this case, generating of the poor regurgitation can prevent the inside of a

cavity 56 thoroughly certainly with a cheap displacing solution beforehand by carrying out the laminar-flow permutation of the expensive sample after a permutation, and the regurgitation of the expensive sample solution can be carried out efficiently.

[0127] Subsequently, as shown in drawing 15, when the configuration of the thickness of the spot 80 on the substrate 10 with which said sample solution was supplied turns into the shape of so-called anchor ring which rose in the periphery part 130, after cooling a substrate 10 at 0 degree C, processing returned to the bottom of the room temperature in which the gas of sufficient volume of 30% or more of humidity exists is performed. By carrying out like this, moisture is supplied to the spot 80 which became anchor ring-like, the fluidity of the sample solution in a spot 80 changes with increase and surface tension in the shape of a semi-sphere, and climax of the periphery part 130 is lost.

[0128] It becomes that in the case of-like [ anchor ring ] the boundary of the periphery part 130 of a spot 80 and a substrate 10 is conspicuous, and it is easy to be observed, and like the sample solution containing a DNA fragment, when forming the spot 80 of a transparent and colorless liquid on a transparent and colorless glass substrate etc., it becomes easy to observe the spot configuration, and has the advantage of becoming easy to inspect the quality of spot formation.

[0129] However, it sets at the spot 80 which presented the shape of such an anchor ring. Even if said the greater part of periphery part 130 (climax part) is flushed in the washing process at the time of subsequent immobilization in many cases Since there were many substantial samples 132 fixed (deeply), when it is used as DNA chip 20 in the periphery part 130, distribution of the quantity of light from fluorescence emitted from a spot 80 The shape of an anchor ring will be presented within a spot 80, and it will become degradation of sensibility, and the cause of dispersion.

[0130] Therefore, in order to reconcile the goodness (the shape of a non-anchor ring) of (the shape of an anchor ring), and a spot configuration in the ease of carrying out of inspection, in case the sample solution is supplied to a substrate 10, it breathes out by an ink jet method etc. and the sample solution is supplied to a substrate 10, and as the sample solution is centralized on the periphery part 130 of the spot 80, the shape of an anchor ring is formed by hydrophobic control with the kinetic energy and substrate 10.

[0131] Then, while making the viscosity of the sample solution increase to extent which does not become spherical with the surface tension of a liquid beforehand, after inspection termination, the method of changing the shape of an anchor ring in the shape of a non-anchor ring is suitable for it, as the fluidity of the sample solution which forms a spot 80 is increased to it with surface tension.

[0132] The approach (processing returned to the bottom of the room temperature in which the gas of sufficient volume of 30% or more of humidity exists after cooling a substrate 10 at 0 degree C) concerning the gestalt of this operation can realize an above-mentioned approach easily.

[0133] And although you may make it supply of the moisture to a spot 80 hit a steam including Myst etc. directly, it is desirable [ supply / it is the process returned to a room temperature after said cooling, and ] at the point that fine waterdrop is supplied to homogeneity to use the moisture which \*\*\*\* on a substrate 10, without passing a spot with superfluous moisture.

[0134] Then, a spot 80 is dried by BEKU [ a substrate 10 / 80 degrees C ] for 1 hour. Although the process returned to a cooling-room temperature may be given after BEKU [ 80 degrees C ] for 1 hour, BEKU processing is needed again in that case.

[0135] Thus, in the manufacture approach of the DNA chip concerning the gestalt of this operation, since he is trying to dilute the concentration of the sample solution in advance of supply of a up to [ the substrate 10 of the sample solution ], when this sample solution is supplied on a substrate 10, as shown in drawing 11 A, the spot 80 by the sample solution does not become semi-sphere-like, but serves as a flat configuration. In this case, since most supplied sample solutions are fixed, also at a subsequent washing process, there is [ of the sample solution ] that no the above will mostly be passed, and the utilization ratio of the sample solution can be raised.

[0136] Moreover, the path of the spot 80 formed on a substrate 10 can be made to equalize by changing the degree of dilution according to the class of DNA fragment contained in the sample solution, and changing the viscosity and surface tension of the sample solution.

[0137] Furthermore, after supplying the sample solution and forming a spot 80 on a substrate 10 again, the configuration of the thickness direction of a spot 80 can be further made into homogeneity by adding the process which supplies moisture to this spot 80.

[0138] Thus, in the gestalt of this operation, the utilization ratio of the high sample solution of cost can be raised, and improvement in the productivity of DNA chip 20 and improvement in the yield can be

aimed at. Moreover, supply control according to the class of sample solution to supply can be performed, equalization of the diameter of a spot formed on a substrate 10 can be attained, and improvement in dependability can be aimed at in the quality list of DNA chip 20.

[0139] In addition, the manufacture approach of the DNA chip concerning this invention of the ability of various configurations to be taken is natural, without deviating not only from the gestalt of above-mentioned operation but from the summary of this invention.

[0140]

[Effect of the Invention] As explained above, according to the manufacture approach of DNA concerning this invention, the utilization ratio of the high sample solution of cost can be raised, and improvement in the productivity of a DNA chip and improvement in the yield can be aimed at. Moreover, dropping control according to the class of dropped sample solution can be performed, equalization of the diameter of a spot formed on a substrate can be attained, and improvement in dependability can be aimed at in the quality list of a DNA chip.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

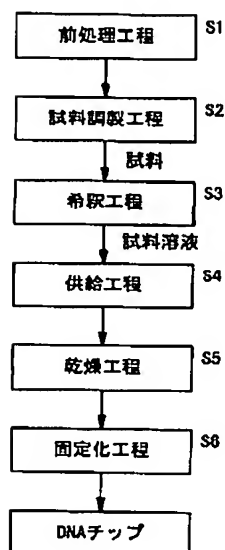
JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

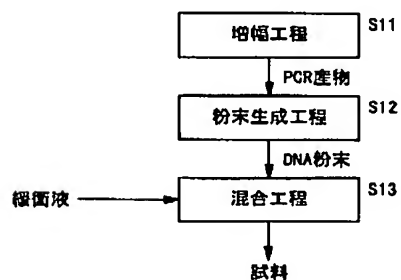
[Drawing 1]

FIG. 1



[Drawing 2]

FIG. 2



[Drawing 3]

FIG. 3



[Drawing 5]

FIG. 5

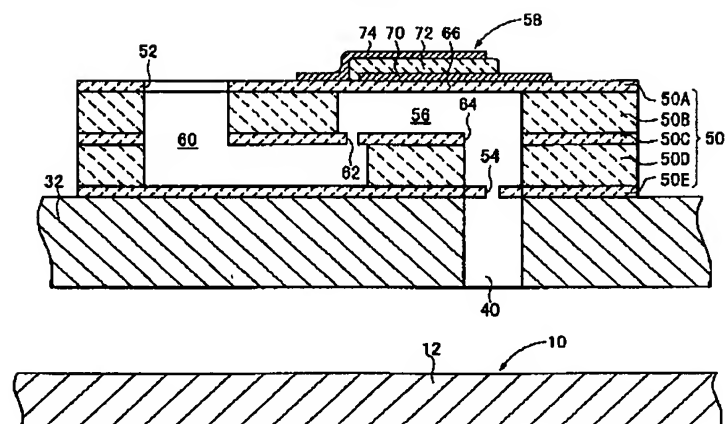
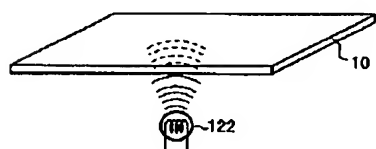
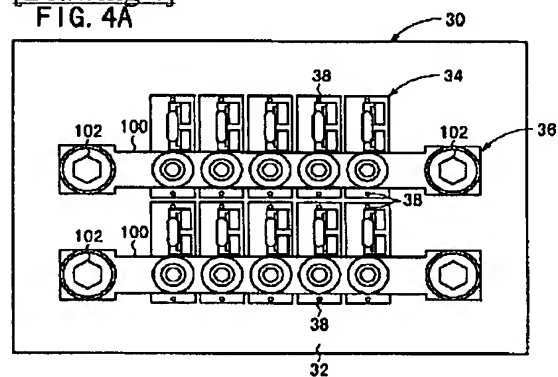
[Drawing 13]  
FIG. 13[Drawing 4]  
FIG. 4A

FIG. 4B

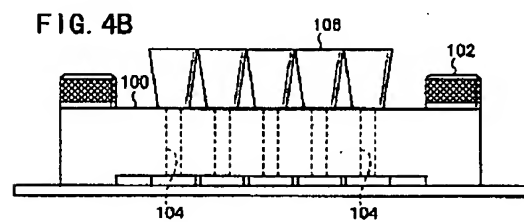
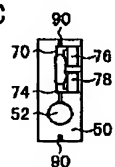
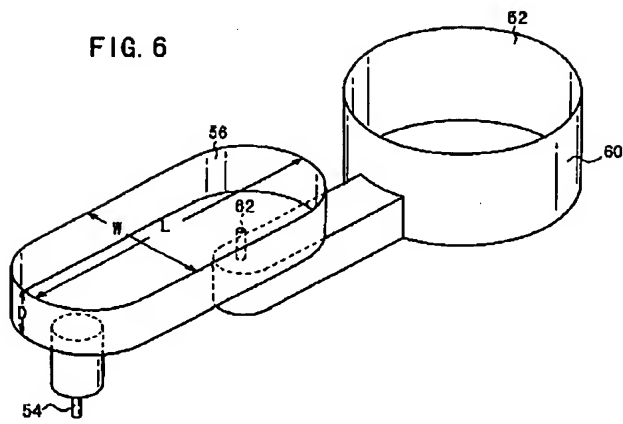


FIG. 4C



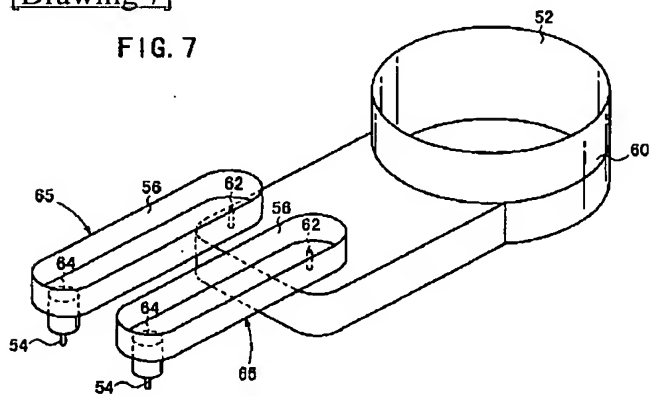
[Drawing 6]

FIG. 6



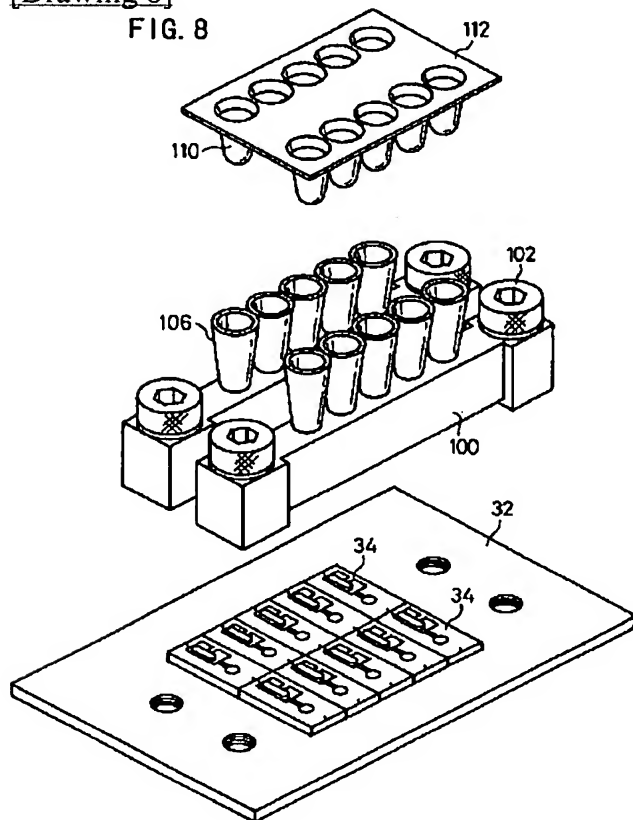
[Drawing 7]

FIG. 7



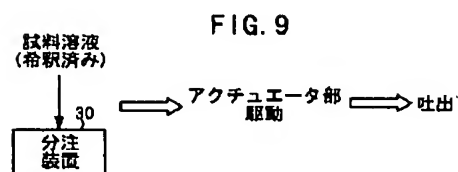
[Drawing 8]

FIG. 8

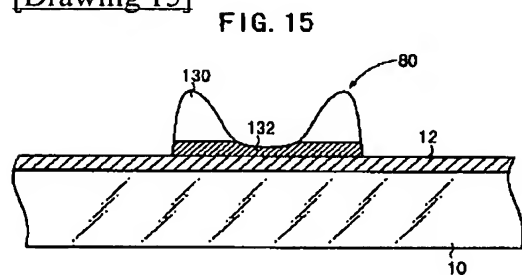


[Drawing 9]

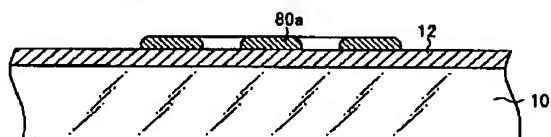
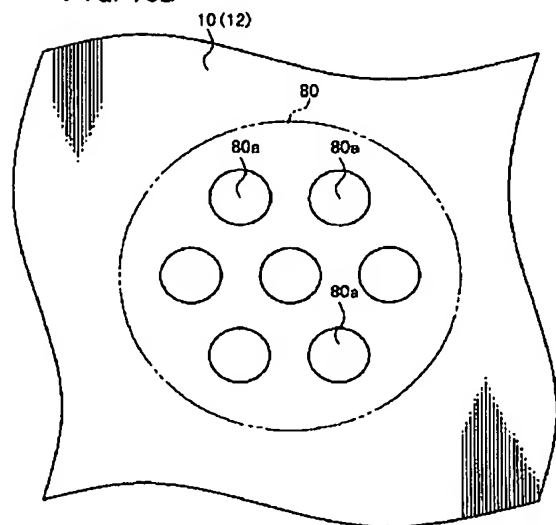




[Drawing 15]



[Drawing 10]

**FIG. 10A****FIG. 10B**

[Drawing 11]

FIG. 11A

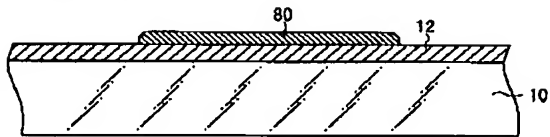
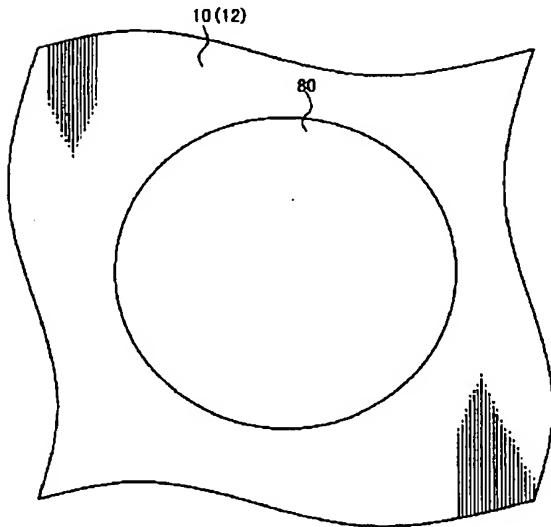


FIG. 11B



[Drawing 12]

FIG. 12A

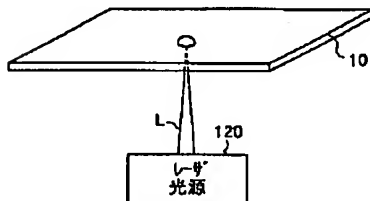
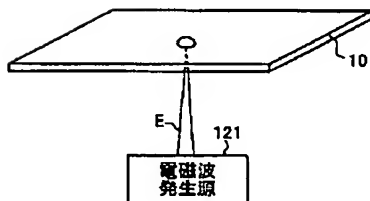
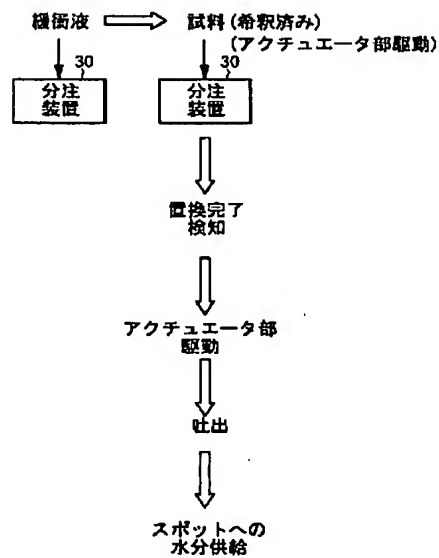


FIG. 12B



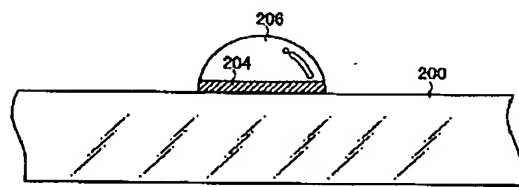
[Drawing 14]

FIG. 14



[Drawing 16]

FIG. 16



[Translation done.]